

THESIS

WÜRZBURG

1968

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg
(Direktor: Professor Dr. med. H. Seeliger)

DIE ZELLULÄRE KINETIK DER ANTIKÖRPERBILDUNG
VON MÄUSEN GEGEN SCHAFERYTHROCYTEN BEI DER
IMMUNOLOGISCHEN ZWEITREAKTION

INAUGURAL - DISSERTATION

LANE MEDICAL LIBRARY

STANFORD UNIVERSITY

verfaßt und der

MEDICAL CENTER

Hohen Medizinischen Fakultät

STANFORD, CALIF. 94305

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Erika Brüß
aus Stein

Würzburg 1968



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg
(Direktor: Professor Dr. med. H. Seeliger)

DIE ZELLULÄRE KINETIK DER ANTIKÖRPERBILDUNG
VON MÄUSEN GEGEN SCHAFFERYTHROCYTEN BEI DER
IMMUNOLOGISCHEN ZWEITREAKTION

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Erika Brüß
aus Stein

Würzburg 1968

Referent: Privatdozent Dr. H. Finger

Korreferent: Professor Dr. H.P.R. Seeliger

Tag der Promotion:

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg.

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit.

EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Die spezifische Antwort des Organismus auf das Eindringen von Material, welches vom Körper als fremd erkannt wird, besteht, sofern es immunogener Natur ist, in der Bildung von Antikörpern. Dabei ist für den Ablauf dieser Reaktion von grundsätzlicher Bedeutung, ob es sich um den erstmaligen Kontakt des Körpers mit diesem Antigen handelt (immunologische Primärreaktion), oder ob durch vorangegangene Auseinandersetzung des Körpers mit diesem Antigen bereits spezifische Antikörper gebildet wurden. In diesem Falle spricht man von einer immunologischen Zweitreaktion bzw. dem Boosterphänomen. Es kommt, verglichen mit der Erstreaktion, zu einer Steigerung des Immunitätsgrades mit früherem und steilerem Anstieg des Antikörperspiegels. Dieser Vorgang ist sowohl bei Schutzimpfungen als auch bei Überempfindlichkeitsreaktionen von großer Bedeutung.

Die immunologische Antwort verschiedener Tierspezies auf unterschiedliche Antigene weist in Abhängigkeit von der Natur des Antigens erhebliche Differenzen auf (UHR u. FINKELSTEIN 1967). So ist bekannt, daß korpuskuläre Antigene, wie Erythrocyten oder intakte Bakterienzellen, stärkere Antigene darstellen als die isolierten, löslichen Antigenkomponenten (MÜLLER 1963).

Seit Einführung des in-vitro-Verfahrens zur quantitativen Erfassung Antikörper bildender Zellen durch JERNE, NORDIN u. HENRY (1963), JERNE u. NORDIN (1963) sowie INGRAHAM u. BUSSARD (1964) ist man in der Lage, genauere Aussagen über die Immunitätsreaktion auf zellulärer Ebene zu machen. Diese Methode gestattet die Durchmusterung lymphatischer Organe auf ihren Gehalt an Hämolysin bildenden Zellen. Allerdings besteht heute weitgehende Einigkeit darüber, daß die als

direkte Technik bezeichnete Originalmethode nur die Bestimmung γ M-Hämolysin bildender Zellen erlaubt, während sich die 7S-Antikörper bildenden Zellen wegen der geringeren hämolysierenden Aktivität der γ G-Globuline dem Nachweis entziehen. Von DRESSER u. WORTIS (1965) sowie STERZL u. RIHA (1965) wurde allerdings gezeigt, daß sich auch 7S-Antikörper bildende Zellen mittels Anwendung von Anti- γ G-Seren quantitativ erfassen lassen. Man bezeichnete dieses Verfahren deshalb auch als indirekte Plaque-Technik. In den vergangenen Jahren wurden direkte und indirekte Plaque-Technik vorwiegend für Untersuchungen über die Cytokinetik der primären Immunitätsreaktion angewendet. Demgegenüber sind Untersuchungen über die im Verlaufe der immunologischen Sekundärreaktion ablaufenden zellulären Vorgänge nur vereinzelt dargestellt worden, die zudem zu divergierenden Ergebnissen geführt hatten.

Die Unterdrückung der primären Immunitätsreaktion durch Injektion immunsuppressiver Substanzen wie Cyclophosphamid ist durch eine Unterdrückung der Proliferation Antikörper bildender Zellen charakterisiert (AISENBERG 1967; FINGER u. EMMERLING 1968). Injiziert man Mäusen simultan mit intraperitoneal applizierten Schaferythrocyten eine ausreichend hohe Dosis Cyclophosphamid, so kommt es auch zu einer starken Verringerung der Milzgewichte (BENEKE, FINGER u. EMMERLING 1968; FINGER u. EMMERLING 1968 a). Umgekehrt führt die zusätzliche Injektion von abgetöteten Keimen von Bordetella pertussis bei mit Schaferythrocyten immunisierten Mäusen zu einer beschleunigt einsetzenden, gesteigerten und verlängerten Proliferation Antikörper bildender Milzzellen, verbunden mit einer hochgradigen und relativ lange andauernden Hypersplenie. Diese Hypersplenie beruht auf einer Verdoppelung der Zellzahl und auf einer gesteigerten Proteinsynthese der Einzelzelle (FINGER, BENEKE u. EMMERLING 1968).

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden:

- a) Wie verhält sich die Kinetik der Antikörperbildung im Verlaufe der immunologischen Sekundärreaktion bei mit Schaferythrocyten immunisierten Mäusen auf zellulärer und humoraler Ebene?

- b) Ist die immunologische Sekundärreaktion geändert, wenn die primäre Immunitätsreaktion von Mäusen gegen Schaferythrocyten durch Cyclophosphamid unterdrückt bzw. durch abgetötete Keuchhustenbakterien gesteigert war, und wenn die Boosterung zu einem Zeitpunkt durchgeführt wurde, wo Milzgewicht und Leukozytenzellen wieder im Normbereich lagen?

MATERIAL UND METHODIK

a) Versuchstiere:

Für die Untersuchungen wurden ausschließlich männliche Mäuse vom Stamm NMRI/Han. mit Gewichten zwischen 18 und 24 g verwendet. Das Gesamtgewicht in den einzelnen Versuchs- und Kontrollgruppen war annähernd gleich. Jeweils 20 Tiere wurden in Makrolonkäfigen gehalten. Sie wurden mit Preßfutter (Pellets "Altromin-R") und Wasser mittels Trinkflasche ad libitum ernährt.

b) Immunisierungsmodus:

Die Immunisierung der Tiere erfolgte ausschließlich mit Schaferthryocyten (SE), die von institutseigenen Tieren gewonnen wurden. Die SE wurden dreimal für 10 Minuten bei 3000 U/min. mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Unmittelbar vor der Behandlung der Tiere wurde diese Suspension mit physiologischer Kochsalzlösung 80 verdünnt, daß die pro Tier applizierte Dosis von 4×10^8 SE in jeweils 0,2 ml enthalten war. Die gleiche Menge an Antigen erhielten die Tiere als Boosterinjektion. Das Antigen wurde intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die SE kamen nicht länger als 5 Tage nach der Entnahme zur Anwendung.

Einem Teil der Tiere wurde zusätzlich als Adjuvans 0,5 ml einer Suspension, die 3×10^8 abgetötete Pertussisorganismen (PO) enthielt, i.p. injiziert. Diese Suspension wurde unmittelbar vor der Behandlung der Tiere aus einer Pertussiskeimsuspension, die pro ml 3×10^{10} Organismen der Phase 1 (nicht adsorbiert, Behringwerke Marburg, Op.-Nr. 3276 und Op.-Nr. 402) enthielt, durch Verdünnen mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt.

Als Depressorsubstanz wurde Cyclophosphamid (Cy) verwendet. Cyclophosphamid (Endoxan[®]) ist N,N-Bis-(2-chloräthyl)-N'-O-propylenphosphorsäureesterdiamid. Jeweils 100 mg dieser Substanz (Asta, Brackwede) wurden in 5 ml Aqua bidest. gelöst und anschließend mit physiologischer Kochsalzlösung weiterverdünnt, so daß danach die Konzentration 4 mg/ml betrug. Davon wurden pro Tier 2 mg jeweils an den Tagen -2, -1, 0 und +1 i.p. injiziert. Die Cyclophosphamidlösung wurde stets frisch hergestellt und innerhalb eines Zeitraumes von 60 min. nach dem Lösen injiziert.

Der Immunisierungstag wird mit Tag 0 bezeichnet, vorangehende Tage werden mit dem Vorzeichen -(minus), nachfolgende Tage mit +(plus) versehen. Die Boosterinjektion erfolgte am Tage +43 nach der Erstimmunisierung.

c) Durchführung der Versuche:

Die Mäuse wurden in vier Gruppen aufgeteilt, dazu kamen noch unbehandelte Kontrolltiere. Die Tiere der Gruppen 1 und 4 erhielten am Tage 0 nur das Antigen. Die Tiere der Gruppe 2 erhielten zusätzlich PO, die der Gruppe 3 zusätzlich Cy injiziert. Den Mäusen der Gruppen 1-3 wurden nochmals am Tage +43 4×10^8 SE injiziert.

Jeweils 6 Mäuse, bei den Kontrolltieren nur 2, jeder Gruppe wurden zu unterschiedlicher Zeit nach der Immunisierung getötet, entblutet sowie die Milzen unter sterilen Kautelen entfernt. Die gewonnenen Mischseren jeder Tiergruppe wurden bei -20°C aufbewahrt und nach Abschluß der Untersuchungen serologisch untersucht.

Unmittelbar nach der Entnahme der Milzen wurden diese gewogen und unter Berücksichtigung des Körpergewichtes der einzelnen Tiere der Milzindex errechnet. Der Milzindex ist definiert als: Milzfeuchtgewicht (mg)/Körpergewicht (g). Anschließend wurde der Gehalt an plaquebildenden Milzzellen mittels der von JERNE et al. (1963) sowie INGRAHAM u. BUS-SARD (1964) entwickelten "direkten" und der nach DRESSER u. WORTIS (1965) und STERZL u. RIHA (1965) angegebenen "indirekten" Methode untersucht.

"Direkte" und "indirekte" Plaque-Technik:

Diese Methode gestattet die Durchmusterung lymphatischer Organe auf ihren Gehalt an Hämolysin bildenden Zellen.

Die Milzsuspensionen wurden unter Verwendung von Eagle's Medium (Behringwerke Marburg) hergestellt und durch einen sterilen Gazefilter filtriert. Die so gewonnenen Suspensionen wurden anschließend 5 min. bei 500 U/min. in Eagle's Medium gewaschen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch in einer Bürkerkammer bei Wahl einer Zellsuspensionsverdünnung von 1:200. An den einzelnen Untersuchungstagen war die Höhe der Zelleinsaat verschieden. Sie richtete sich nach der voraussichtlich für den jeweiligen Untersuchungstag zu erwartenden Zahl an Antikörper bildenden Zellen. Jeweils 0,1 ml der Milzszellsuspension und 0,1 ml einer Suspension von SE (4×10^8 SE) wurden in 2 ml autoklaviertes und gefiltertes Eagle's Medium mit 0,7 % Agarose (Behringwerke Marburg) pipettiert. Das Gemisch befand sich während dieses Vorganges in einem bei 47°C temperierten Wasserbad. Nach gründlichem Aufschütteln wurde der Inhalt der Röhrchen sorgfältig auf graduierte Petrischalen (87 mm Durchmesser) auf eine vorher hergestellte ca. 3 mm dicke Agargrundschrift geschüttet. Diese Agargrundschrift wurde mit 1,4 %igem Oxoidagar Nr. 3 (Oxoid Limited, London), dem pro ml 0,025 ml einer zuvor hergestellten Lösung von Diäthylaminoäthyl-Dextran (Pharmacia, Uppsala) (1g/100 ml physiologischer Kochsalzlösung) zugesetzt wurden, hergestellt. Um eine möglichst homogene Verteilung der Zell-Agar-Gemische zu gewährleisten, wurden die Platten bis zum Festwerden der Agarose-

überschicht auf plane Glasplatten gestellt und danach für 1 Std. bei 37°C im Brutschrank gehalten. Von jeder Milzzellsuspension wurden 4 Platten hergestellt, und zwar je 2 Platten für die "direkte" und "indirekte" Methode. Im ersten Falle wurden nach einer einstündigen Bebrütung bei 37°C auf jede Agarplatte 2 ml von 1:10 mit MBB (modified barbiturate buffer, 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt), pH 7,3-7,4, verdünntem Meerschweinchenserum gegeben.

Anschließend wurden die so behandelten Platten für eine weitere halbe Stunde bei 37°C bebrütet, und danach erfolgte mit Hilfe eines Plattenmikroskopes (Vergrößerung 1:10 bis 1:40) die Auszählung der "direkten" Plaques. Auf eine Färbung mit Benzidin-Eisessig wurde in der Regel verzichtet.

Ausführung der "indirekten" Technik:

Die für die indirekte Methode vorgesehenen Platten wurden nach der anfänglichen einstündigen Bebrütung bei 37°C mit je 2 ml eines 0,5 %igen inaktivierten und mit SE absorbier-ten Anti-Maus- γ G-Serum als "Entwicklerserum" beschickt und danach für eine weitere Stunde bei 37°C im Brutschrank belastet.**) Anschließend wurde das "Entwicklerserum" von den Platten abgegossen und den Platten jeweils 2 ml des 1:10 verdünnten Meerschweinchenserum zugegeben. Danach wurde nochmals für 30 min. bei 37°C bebrütet. Anschließend wurden wie oben für die "direkten" Plaques beschrieben, die "indirekten" Plaques ausgezählt.

Bestimmung der Serumantikörper:

Die Bestimmung der Hämolsyntiter wurde mittels der von TALIOFERRO u. TALIOFERRO (1950) und (1952) entwickelten Technik (cf. Campbell et al. 1964) durchgeführt. Die Titer sind in 50 % Hämolyse-Einheiten angegeben. Darunter ist diejenige Hämolysinmenge pro ml Serum zu verstehen, die erforderlich ist, um 50 % einer 1 %igen Erythrocytensuspension in Gegenwart von 4C'H₅O (50 %-Einheiten Komplement) zu lysieren. Als Komplement wurde stets bei -20°C aufbewahrtes Meerschweinchenserum verwendet. Als Referenzserum diente ein handelsüblicher Ambozeptor (Behringwerke Marburg). Vor jeder Hämolysinbestimmung wurde die Aktivität des Komplementes erneut ermittelt.

Für die Bestimmung des Anteiles an 2-Mercaptoäthanol (MÄ-) resistenten Hämolysinen wurden die Seren im Volumenverhältnis 1:5 mit modifiziertem Veronalpuffer (MBB, pH 7,3 - 7,4) verdünnt, der 0,125 Mol 2-MÄ enthielt.**) Gesamthämolysine und

-
- *) Das Anti-Maus- γ G-Serum wurde von der serologischen Abteilung des Hygiene-Institutes der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt. Seine Herstellung wurde an anderer Stelle beschrieben (FINGER u. EMMERLING 1968).
 - **) Die Bestimmung der Hämolsyntiter erfolgte durch die serologische Abteilung des Hygiene-Institutes der Universität Würzburg.

2-MÄ- resistente Hämolysine wurden parallel im gleichen Versuchsansatz ermittelt.

d) Statistische Auswertung:

Die statistische Signifikanzberechnung wurde mittels des t-Testes nach Student durchgeführt.

ERGEBNISSE

I. BEFUNDE NACH ERSTIMMUNISIERUNG:

a) Der Einfluß von abgetöteten Keuchhustenbakterien und Cyclophosphamid auf Milzgewicht und Milzindex von mit Schaferythrocyten immunisierten Mäusen.

Bei Mäusen, denen simultan Schaferythrocyten und Pertussisorganismen i.p. injiziert wurden, fanden sich erhöhte Milzfeuchtgewichte, was in Tab. 1 dargestellt ist. Aus dieser tabellarischen Darstellung ist ersichtlich, daß bereits am Tage +3 das Milzfeuchtgewicht der zusätzlich mit PO behandelten Tiere signifikant gesteigert ist. Auf dem Höhepunkt der primären Immunitätsreaktion findet man eine Verdoppelung des Milzfeuchtgewichtes. Diese Gewichtsvermehrung hält über einen längeren Zeitraum an. Aus Tab. 2 kann ersehen werden, daß die Milzgewichtsvermehrung nicht durch einen allgemeinen Wachstumsreiz bedingt ist, da die Milzindices der Tiere, die zusätzlich mit PO behandelt wurden, gleichfalls signifikant erhöht sind.

Im Gegensatz dazu zeigten Milzgewicht und Milzindex bei mit Cyclophosphamid behandelten Tieren bis zum Tage +4 signifikant niedrigere Werte als die Kontrollen (Tab. 1 + 2). Danach erreichten die Milzgewichte sogar höhere Werte als die nur mit SE immunisierten Mäuse.

b) Der Einfluß von abgetöteten Keuchhustenbakterien und Cyclophosphamid auf die Kinetik direkter plaquebildender Milzzellen (DPMZ) von mit Schaferythrocyten immunisierten Mäusen.

Im Vergleich zur alleinigen Erythrocyteninjektion bewirkt die zusätzliche Injektion von PO eine Verkürzung der Latenzphase. So wurden am Tage +3 bei den zusätzlich mit PO behandelten Tieren wenigstens um 100 % höhere Zahlen an DPMZ ermittelt als in den Milzen der korrespondierenden Kontrollen (Abb. 1). Die

höchsten DPMZ-Werte wurden in beiden Tiergruppen am Tage +5 ermittelt, wobei die höheren Zahlen in den Milzen der zusätzlich mit PO behandelten Tiere gefunden wurden. Die Differenzen der Mittelwerte erwiesen sich jedoch nicht als statistisch signifikant. Während bei den mit SE behandelten Mäusen die Zahlen an DPMZ nach dem Tage +5 wieder steil abfallen, verläuft die Kurve bei den zusätzlich mit PO behandelten Tieren wesentlich flacher, so daß noch am Tage +44 signifikant höhere direkte Plaquezahlen ermittelt wurden als bei den nur mit SE behandelten Mäusen.

Der Einfluß von Cy auf die DPMZ ist aus der Abb. 5 ersichtlich. In der ersten Woche nach der Immunisierung entspricht die Zahl der DPMZ Werten, die man auch bei unbehandelten Kontrolltieren findet. Erst nach dem Tage +10 steigen die DPMZ geringfügig an und erreichen auch danach nur einen Maximalwert (Tag +17), der mit $90 \text{ DPMZ}/10^6$ Milzzellen nur ca. 5 % des Höchstwertes der Kontrolle ausmacht.

c) Der Einfluß von abgetöteten Keuchhustenbakterien und Cyclophosphamid auf die Kinetik indirekter plaquebildender Milzzellen (IPMZ) von mit Schaeferythrocyten immunisierten Mäusen.

Die ermittelten Werte für die IPMZ sind in der Abb. 2 dargestellt. Die Zahl der IPMZ ergibt sich rechnerisch durch die Subtraktion von 50 % der Zahl an DPMZ von der Gesamtzahl der an den einzelnen Untersuchungstagen bestimmten Hämolysin produzierenden Zellen, die nach Anwendung eines Anti-Maus- γ G-Serums zur Ausbildung gelangen.

Während bei den nur mit SE behandelten Mäusen die Maximalwerte an IPMZ am Tage +5 gefunden werden, kam es bei den zusätzlich mit PO behandelten Mäusen zu einem weiteren Anstieg, so daß die Höchstzahlen, die signifikant über denen der Kontrolle lagen, erst am Tage +7 zur Ausbildung gelangten. Nach Erreichen des Höhepunktes fielen die IPMZ-Werte bei den nur mit SE immunisierten Tieren rasch ab, wenn auch die Kurve wesentlich flacher verläuft als bei den DPMZ. Noch am Tage +44 wurden $100\text{--}150 \text{ IPMZ}/10^6$ Milzzellen gezählt. Demgegenüber fanden sich zu

diesem Zeitpunkt in der PO-Gruppe noch 1000 IPMZ/ 10^6 Milzzellen. Dem entspricht, daß die IPMZ-Zahlen bei den zusätzlich mit PO behandelten Mäusen nach Erreichen der maximalen zellulären Aktivität einen nur zögernden Abfall erkennen lassen (Abb. 2).

In der Cyclophosphamid-Gruppe verlief die Kinetik der IPMZ analog der der DPMZ (Abb. 6). Erst nach dem Tage +10 setzte die Proliferation der IPMZ ein, die ihren Höhepunkt am Tage +17 erreichte. Dabei repräsentierte der Maximalwert nur 5 % des der Kontrolle.

d) Der Einfluß von abgetöteten Keuchhustenbakterien und Cyclophosphamid auf die Bildung humoraler Antikörper von mit Schaf-erythrocyten immunisierten Mäusen.

Wie die Abb. 9 zeigt, konnte am Tage +3 nur in den Seren der zusätzlich mit PO behandelten Tieren ein geringer Hämolytiter gemessen werden. Die höchsten Titerwerte wurden sowohl für die mit SE als auch für die mit SE und PO behandelten Tiere am Tage +7 gefunden. Danach fielen die Hämolytiter der nur mit SE behandelten Mäuse rasch bis zum Tage +10 ab, während sie bei der PO-Gruppe nur einen geringfügigen Abfall erkennen ließen. Am Tage +7 erwiesen sich die gefundenen Hämolytine als fast vollständig 2-MÄ-sensibel, während danach im steigenden Maße 2-MÄ-resistente Hämolytine nachweisbar waren. Vom Tage +17 an erwiesen sich die Hämolytine als nahezu komplett 2-MÄ-resistent.

In den Seren der zusätzlich mit Cy behandelten Mäuse ließen sich bis zum Tage +44 keine nennenswerten Hämolytiter nachweisen.

Wie aus der Abb. 9 ersehen werden kann, lassen die Hämolytiter eine enge Korrelation zur Kinetik der plaquebildenden Milzzellen erkennen.

II. BEFUNDE NACH ZWEITIMMUNISIERUNG:

- a) Der Einfluß von abgetöteten Keuchhustenbakterien und Cyclophosphamid auf die Kinetik der DPMZ von 6 Wochen später nur mit Schaferythrocyten immunisierten Mäusen.

Erhielten mit 4×10^8 SE immunisierte Mäuse 6 Wochen später eine Zweitinjektion von 4×10^8 SE (Abb. 3), so kam es zwischen den Tagen +2 und +3 zu einem steilen Anstieg der DPMZ, wenn auch der Maximalwert noch nicht einmal 25 % des nach primärer Immunisierung gefundenen ausmachte. Der danach beobachtbare Abfall vollzog sich so rasch, daß nach dem Tage +7 nur noch 20 - 30 DPMZ/ 10^6 Milzzellen gefunden wurden. Hatten die Mäuse mit der Erstinjektion des Erythrocytenantigens PO erhalten, so setzte die Proliferation der DPMZ, ausgehend von einem Vergleich zur Kontrolle erhöhten Niveau, bereits zwischen den Tagen +1 und +2 ein, um am Tage +4 den Höchstwert zu erreichen. Dieser repräsentierte aber auch noch nicht einmal ein Viertel des nach primärer Immunisierung gefundenen Gipfelwertes. Der danach einsetzende Abfall der Zahlen an DPMZ war im Vergleich zur Kontrolle verzögert. Noch bei Versuchsende ließen sich in der PO-Gruppe ca. 100 DPMZ/ 10^6 Milzzellen nachweisen.

Aus der Abb. 7 ist schließlich ersichtlich, daß Mäuse, bei denen die primäre Immunitätsreaktion durch Cy unterdrückt worden war und die 6 Wochen später eine Boosterinjektion von 4×10^8 SE erhielten, mit einer Proliferation von DPMZ reagierten, wobei die Maximalzahl am Tage +3 ermittelt wurde. Wenn in dieser Gruppe auch nicht die Werte der Kontrolle erreicht wurden, ist andererseits ein im Vergleich zur Kontrollgruppe analoger Kurvenverlauf feststellbar (Abb. 7).

- b) Der Einfluß von abgetöteten Keuchhustenbakterien und Cyclophosphamid auf die Kinetik der IPMZ von 6 Wochen später nur mit Schaferythrocyten immunisierten Mäusen.

Aus Abb. 4 läßt sich ersehen, daß die Proliferation der IPMZ nach einer Zweitinjektion von SE zur gleichen Zeit einsetzt

wie die der DPMZ. In der Kontrollgruppe wurde der durchschnittliche Maximalwert, der mit $11\,500\text{ IPMZ}/10^6$ Milzzellen mehr als doppelt so hoch lag wie nach der erstmaligen Antigenapplikation, am Tage +4 gefunden. Danach fielen die IPMZ-Zahlen rasch wieder ab, lediglich unterbrochen von einem neuerlichen Anstieg am Tage +10. Dieser biphasische Kurvenverlauf kommt auch in der PO-Gruppe zur Ausbildung, bei der der ebenfalls am Tage +4 ermittelte Maximalwert um ca. 100 % über dem der Kontrolle lag. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß die Mäuse der PO-Gruppe zur Zeit der Boosterinjektion noch wenigstens 10 mal mehr $\text{IPMZ}/10^6$ Milzzellen enthielten als die Tiere der nur mit SE immunisierten Kontrollgruppe.

Aus Abb. 4 kann weiterhin ersehen werden, daß der Abfall der IPMZ-Werte nach Erreichen des Höhepunktes wesentlich verzögert erfolgt als in der Kontrollgruppe.

Die Kinetik der IPMZ nach Boosterung der Cy-Gruppe ist in der Abb. 8 veranschaulicht. Auch die Tiere dieser Gruppe erreichen den Höhepunkt der zellulären Reaktion am Tage +4. Ein Unterschied zur Kontrollgruppe ergibt sich lediglich dadurch, daß die zelluläre Reaktion auf etwas niedrigerem Niveau abläuft. Bemerkenswert ist aber, daß die Kinetik der IPMZ in der Cy-Gruppe nach Boosterung eine typische Sekundärreaktion darstellt.

c) Der Einfluß von abgetöteten Keuchhustenbakterien und Cyclophosphamid auf die humorale Antikörpertiter von 6 Wochen später nur mit Schaferythrocyten immunisierten Mäusen.

Die Ergebnisse der Hämolysintiterbestimmungen sind in den Abb. 10 und 11 dargestellt. In den Seren nur mit SE immunisierter Tiere kam es zu einem Anstieg der Gesamthämolysine, die an den Tagen +5 und +7 ihre Gipfel erreichten, die nicht wesentlich über dem Maximalwert der Primärreaktion lagen. Während bei der Primärreaktion am Höhepunkt der Immunitätsreaktion die Hämolysine fast ausschließlich 2-MÄ-sensibel waren, erwiesen sie sich

am Tage +5 nach der Boosterung zu etwas mehr als 50 % als 2-MÄ-sensibel. Fünf Tage später waren die Hämolysintiter so gut wie vollständig 2-MÄ-resistent. Nach dem Tage +7 fielen die Hämolysintiter kontinuierlich ab, um am Tage +35 bei 34 Hämolyisin-Einheiten zu liegen.

War die primäre Immunisierung der Mäuse zusammen mit PO erfolgt, so ließen sich erhöhte Serumhämolysintiter feststellen, wobei die Gesamthämolysine am Tage +5 einen ersten Gipfel erkennen ließen, gefolgt von einem zweiten Gipfel am Tage +10.

Die vorausgehend mit PO behandelten Tiere zeigten nicht nur einen höheren Maximalwert an hämolysierenden Antikörpern, sondern zudem waren die erhöhten Titer zeitlich verlängert nachweisbar. Parallel zu dem steilen Abfall der Serumhämolysintiter am Tage +14 fand sich an diesem Tage auch ein Abfall der IPMZ (Abb. 8). Sowohl Serumhämolysintiter als auch Zahl der IPMZ stiegen bis zum Tage +21 nochmals an.

Wurde die primäre Immunitätsreaktion durch Cy unterdrückt, so ließen sich während der 44 tägigen Beobachtungszeit keine Hämolysine nachweisen. Wie Abb. 11 zu erkennen gibt, wurden jedoch nach Boosterinjektion in den Seren dieser Versuchsgruppe Hämolysine nachgewiesen, wobei der höchste Titerwert am Tage +10 ermittelt wurde, die nahezu vollständig 2-MÄ-resistent waren. Die Spitzentiter lagen aber unter denen der Kontrollgruppe.

DISKUSSION

Zahlreiche Untersuchungen bei verschiedenen Tierarten haben gezeigt, daß die immunologische Sekundärreaktion gegenüber einer Vielzahl unterschiedlicher korpuskulärer und löslicher Antigene weitgehend einheitlich verläuft, während die Kinetik der Antikörperbildung nach primärer Immunisierung in Abhängigkeit von der Natur des Antigens erhebliche Unterschiede erkennen läßt. So ist die Booster-Reaktion in der Regel durch die kürzere Latenzphase und die Ausbildung höherer Serumantikörpertiter von der immunologischen Primärreaktion unterschieden, wobei für die Phase des exponentiellen Anstieges eine Verdoppelungszeit von 7 Stunden anzunehmen ist (TALIOFERRO u. TALIOFERRO 1952; DIXON, MAURER u. DEICHMILLER 1954; MAKINODAN u. GENGOZIAN 1958, 1958 a; LA VIA 1964; SVEHAG u. MANDEL 1964). Zudem wurde nach Zweitimmunisierung mit heterologen Serumproteinen eine im Vergleich zur Erstimmunisierung bevorzugte Synthese von 7S-Antikörpern gefunden (DIXON 1954). Nach TALIOFERRO u. TALIOFERRO (1952) sowie LA VIA (1964) stellt die Hämolysinbildung von Kaninchen gegen Schaferythrocyten insofern eine Ausnahme von dieser Regel dar, als hier Primär- und Sekundärantwort eine weitgehend analoge Kinetik erkennen lassen.

Da zwischen der Hämolysinbildung bei Mäusen nach primärer Stimulierung mit Schaferythrocyten und der Proliferation Antikörper bildender Zellen in lymphatischen Organen eine Korrelation besteht, lag die Vermutung nahe, daß sich auch die nach sekundärer Antigeninjektion verfrüht einsetzende und gesteigerte Antikörperbildung als Funktion der Menge von gebildeten Antikörperproduzenten darstellt. Daß diese Vorstellungen zutreffen, konnte mit den Versuchsergebnissen dieser Arbeit gezeigt werden. Wurden Mäuse erstmals mit 4×10^8 Schaferythrocyten intraperitoneal immunisiert, wurde der Maximalwert an DPMZ mit ca. $2000/10^6$ Milzzellen am Tage +5 ermittelt (Abb. 1). Danach fielen die Zahlen an DPMZ steil ab, so

daß am Tage +17 nahezu wieder Normwerte erreicht waren. Die Höchstzahlen an korrigierter IPMZ/ 10^6 Milzzellen wurden ebenfalls am Tage +5 mit einem Wert von $4\ 600/10^6$ Milzzellen gefunden, während 2 Tage später nur noch $1\ 400$ IPMZ/ 10^6 Milzzellen nachweisbar waren. Der weitere Abfall erfolgte nur zögernd, so daß noch 44 Tage nach der Immunisierung ca. 100 IPMZ/ 10^6 Milzzellen gefunden wurden (Abb. 2). Wurden derart vorbehandelte Mäuse 43 Tage später durch eine Zweitinjektion von 4×10^8 SE geboostert, war eine geringgradige Vermehrung der 19S-Antikörper bildenden Zellen erstmals am Tage +2 feststellbar. Ein exponentieller Anstieg der DPMZ-Werte erfolgte aber erst zwischen den Tagen +2 und +3, wobei allerdings der am Tage +3 ermittelte Maximalwert noch nicht einmal 25 % des nach primärer Immunisierung gefundenen Höchstwertes ausmachte. Der danach beobachtbare Abfall der DPMZ-Werte vollzog sich so rasch, daß nach dem Tage +7 nur noch $20 - 30$ DPMZ/ 10^6 Milzzellen gefunden wurden (Verlaufskurve I, Abb. 3). Ganz entsprechende Befunde sind auch von HEGE u. COLE (1966) mitgeteilt worden, die die Cytokinetik der immunologischen Sekundärreaktion am analogen Modell mittels Anwendung der direkten Jerne-Technik sowie parallel dazu durchgeführte Serumhämolysinbestimmungen ermittelt hatten. Von diesen Autoren wurde weiterhin berichtet, daß der Grad der im Vergleich zur Primärantwort geminderten Proliferation an DPMZ von dem zeitlichen Intervall zwischen Erst- und Zweitimmunisierung abhängig ist. Wurde nämlich die Zweitinjektion eine Woche nach der Erstimmunisierung verabfolgt, lagen die Zahlen an DPMZ nur geringfügig unter denen, die nach primärer Sensibilisierung ermittelt wurden. Demgegenüber führte die nach 3 wöchiger Latenz applizierte Boosterinjektion am Tage +4 zur Ausbildung einer Maximalzahl in DPMZ, die nur 10 % des nach Erstimmunisierung erhaltenen Wertes ausmachte. Wieder höhere DPMZ-Zahlen wurden erhalten, wenn zwischen Erst- und Zweitimmunisierung ein injektionsfreies Intervall von 6 bzw. 9 Wochen bestanden hatte. Als HEGE u. COLE 1965 diese Untersuchungen durchführten, war die Methode für die quantitative Bestimmung γ G/ γ A-Antikörper bildender Zellen noch nicht bekannt. Wie die eigenen Untersuchungen zeigten, ist aber die Kinetik der immunologischen

Sekundärreaktion erwartungsgemäß durch eine bevorzugte Bildung 7S-Antikörper bildender Zellen charakterisiert.

Ein Vergleich der Ergebnisse in Abb. 2 und 4 zeigt, daß die entscheidende Änderung der Kinetik Hämolysin produzierender Zellen nach Boosterung die IPMZ betrifft. Die Vermehrung dieser Zellen setzt nach Boosterung zur gleichen Zeit ein wie die der DPMZ, während ihr Höhepunkt erst einen Tag später, also am Tage +4 erreicht wird. Dieser Maximalwert an IPMZ lag mit ca. 11 500 IPMZ/ 10^6 Milzzellen fast 3 mal so hoch wie der Höchstwert nach primärer Immunisierung am Tage +5. Danach fielen die IPMZ-Werte - ebenso wie nach Erreichen des Gipfels im Verlaufe der immunologischen Primärreaktion - steil ab, so daß am Tage +5 noch ca. 50 % und am Tage +7 nur noch ca. 7 % des Maximalwertes an IPMZ nachweisbar waren. Ein erneuter geringgradiger Anstieg auf 1 350 IPMZ/ 10^6 Milzzellen wurde am Tage +10 gesehen. Nach dem Tage +14 vollzog sich der weitere Abfall wesentlich verzögerter, so daß zwischen dem 21. und 35. Tage nach Zweitimmunisierung noch IPMZ-Werte ermittelt wurden, die 300 - 500 IPMZ/ 10^6 Milzzellen betrugen. Aus diesen Befunden geht somit hervor, daß auf dem Höhepunkt der zellulären Aktivität nach Boosterung unter den geschilderten Bedingungen ca. 1,2 % aller Milzzellen als Antikörper bildende Zellen fungieren, was mit dem jüngst von STERZL (1967) ermittelten Wert von 1 % gut übereinstimmt.

Auch die Serumhämolysinbestimmungen ergaben, daß die 6 Wochen nach Erstimmunisierung verabfolgte Zweitinjektion die bevorzugte Bildung 2-Mercaptoöthanol-resistenter Hämolysine bewirkte (Kurvenpaar I, Abb. 10), während 7S-Hämolysine nach primärer Immunisierung erstmals am Tage +7 in minimaler Menge nachweisbar waren und auch danach zu keinem Zeitpunkt das Titerniveau der 19S-Hämolysine erreichten (Abb. 9), deren Maximalwert regelmäßig zwischen den Tagen +4 und +7 gefunden wurde (JERNE et al. 1963; HEGE u. COLE 1966; TUSCH 1968).

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen sollte nicht nur die Kinetik der Antikörperbildung nach Boosterung auf zelluläre und humoraler Ebene untersucht werden, sondern zudem geprüft werden, ob die Kinetik der Antikörperbildung nach Boosterung geändert abläuft, wenn die primäre Immunitätsreaktion durch Applikation abgetöteter

Zellen von B.pertussis gesteigert oder durch Injektion von Cyclophosphamid unterdrückt worden war.

Die simultane Injektion von Schafererythrocyten und abgetöteten Keuchhustenbakterien bewirkt eine hochgradige Hypersplenie, der eine Verdoppelung der Zellzahl und eine gesteigerte Proteinsynthese der Einzelzelle zugrunde liegt (FINGER, BENEKE u. EMMERLING 1968, 1968 a). Die Zellvermehrung betrifft mit Sicherheit auch solche, aus denen sich die Antikörper bildenden Zellen entwickeln, da sich nach zusätzlicher Injektion von abgetöteten Keuchhustenbakterien bei verkürzter Latenzphase über längere Zeit signifikant mehr γ_M - und vornehmlich γ_G/γ_A -Antikörper bildende Zellen nachweisen lassen als nach alleiniger Erythrocyteninjektion (BENEKE, FINGER u. EMMERLING 1968; FINGER 1968; TUSCH 1968). Entsprechend finden sich nach zusätzlicher Injektion von abgetöteten Keuchhustenbakterien auch vermehrt humorale Agglutinine und Hämolsine. Demgegenüber bewirkt die Injektion von 200 - 300 mg/kg Cyclophosphamid, appliziert als Einzeldosis am Tage der Immunisierung mit 4×10^8 Schafererythrocyten oder in Form von 4 gleich großen Teildosen vom Tage -2 bis zum Tage +1 eine Abnahme der feuchten Milzgewichte um mehr als 50 % am Tage +4, der histologisch ein nahezu kompletter Schwund der Zellen der roten Pulpa entspricht (BENEKE, FINGER u. EMMERLING 1968). Gleichzeitig fand sich in den Milzen der zusätzlich mit Cyclophosphamid behandelten Mäuse eine hochgradige Unterdrückung der Proliferation Antikörper bildender Milzzellen; erst zwischen den Tagen +10 und +17 war eine minimale Vermehrung der DPMZ und IPMZ nachweisbar, wobei die Höchstwerte jedoch nur 5 % bzw. 8 % der korrespondierenden Werte der Kontrollgruppe ausmachten. Dementsprechend waren während des 6 wöchigen Versuchszeitraumes keine Hämolsine und auch keine nennenswerten Hämagglutininmenngen nachweisbar (FINGER u. EMMERLING 1968 a). Analoge Befunde waren von AISENBERG (1967) erhoben worden, der sogar den Status einer kompletten immunologischen Toleranz erzeugen konnte, wenn er zusätzlich zum applizierten Cyclophosphamid exzessiv hohe Dosen an Erythrocytenantigen injizierte. Wie die in den Tab. 1 und 2 und in

den Abb. 1, 2, 5 und 6 zusammengefaßten Befunde, die die Kinetik der primären Immunitätsreaktion von Mäusen gegenüber Schaferythrocyten unter unterschiedlichen Bedingungen darstellen, erkennen lassen, konnte die oben beschriebene Änderung der Kinetik der primären Immunitätsreaktion durch abgetötete Keuchhustenbakterien und Cyclophosphamid in vollem Umfange bestätigt werden.

Bei der erwachsenen Maus enthält die Milz etwa ein Drittel aller lymphatischen Zellen, die mit der Antikörperbildung in kausalem Zusammenhang stehen (MAKINODAN u. ALBRIGHT 1966). Für die Prüfung der Frage, ob zusammen mit der ersten immunisierenden Injektion verabfolgte Zellen von B. pertussis oder Cyclophosphamid auch das lymphoretikuläre Gewebe der Milz für die immunologische Sekundärreaktion präparieren, erschien es daher notwendig, das zweite antigene Stimulans erst zu einem Zeitpunkt zu setzen, zu dem Milzgewicht und Blutleukocyten wieder Normwerte erkennen lassen. Das ist spätestens nach 4 - 5 Wochen der Fall, so daß die Wahl eines 6 wöchigen Intervalls zwischen Erst- und Zweitimmunisierung als ausreichend angesehen werden kann. Die simultane i.p. Injektion von 4×10^8 SE und 3×10^9 PO bewirkte im Vergleich zur alleinigen Erythrocyteninjektion eine Vermehrung 19S- und 7S-Antikörper bildender Zellen, wobei die ermittelten Werte nach Erreichen des Höhepunktes einen deutlich verzögerten Abfall erkennen ließen (Abb. 3 und 4). So waren am Tage der Boosterung bei den zusätzlich mit PO behandelten Mäusen noch etwa 7 mal mehr IPMZ nachweisbar als in der korrespondierenden Kontrollgruppe (Abb. 4). Gleichsinnig verhielten sich die erhöht gefundenen 7S-Serumhämolysintiter (Abb. 1a). Diese Befunde stellen eine Bestätigung anderer Autoren (TUSCH 1968; FINGER, EMMERLING u. SCHMIDT 1967; ROWLEY 1968) dar.

Wurde Mäusen, die die primäre Antigeninjektion zusammen mit PO erhalten hatten, 43 Tage später eine zweite Injektion von 4×10^8 SE (ohne PO) i.p. injiziert, trat das Maximum der DPMZ 4 Tage später mit einem Wert von etwa $1000/10^6$ Milzzellen auf. Das kommt den etwa 20 % des DPMZ-Höchstwertes gleich, der nach primärer Immunisierung in dieser Gruppe ermittelt worden war (Abb. 3). Der Abfall vollzog sich jedoch wesentlich langsamer als in der zugeordneten

Kontrollgruppe, so daß noch 35 Tage nach Boosterung ein DPMZ-Verhältnis von 7,5:1 für die beiden Versuchsgruppen nachweisbar war. Der Höchstwert an IPMZ/ 10^6 Milzzellen fand sich bei der Pertussisgruppe ebenfalls 4 Tage nach Boosterung und lag mit einem Wert von etwa 21 000 um knapp 100 % über dem der korrespondierenden Kontrollgruppe (Abb. 4). Die Prüfung auf statistische Signifikanz ergab, daß die Differenz der mittleren Maximalwerte beider Versuchsgruppen mit einem t-Wert von 2,409 statistisch signifikant war. Auch gab sich danach ein verzögerter Abfall der IPMZ-Werte zu erkennen, so daß z.B. 7 Tage nach Boosterung in der Pertussis-Gruppe rund 14 mal mehr IPMZ gezählt wurden als in der entsprechenden Kontrollgruppe (Abb. 4). Den erhöht gefundenen IPMZ-Werten entsprachen gesteigerte 7S-Serumhämolysintiter (Abb. 10). Aus diesen Befunden kann gefolgert werden, daß die zusätzliche Injektion von abgetöteten Keuchhustenbakterien zum erstmalig applizierten Erythrocytenantigen das lymphoretikuläre Gewebe der Maus für eine gesteigerte immunologische Sekundärreaktion präpariert. Dieser Befund scheint die ursprünglich von NOSSAL, AUSTIN u. ADA (1965) formulierte Hypothese zu stützen, die seinerzeit schrieben: "This concept is predicated on the hypothesis that the way in which an animal responds to a primary injection of antigen is of predictive value for the secondary response." Daß diese Hypothese jedoch keine allgemeine Bedeutung haben kann, ergibt sich aus den hier dargestellten Ergebnissen der Cyclophosphamid-Versuche. In Übereinstimmung mit den Befunden von AISENBERG (1967) sowie FINGER u. EMMERLING (1968 a) ließ sich nachweisen, daß die Applikation hoher Cyclophosphamiddosen zur Zeit der primären Immunisierung eine nahezu komplette Unterdrückung der primären Immunitätsreaktion bewirkt. Während Serumhämolysine im Verlaufe des 44 tägigen Beobachtungszeitraumes überhaupt nicht nachweisbar waren (Abb. 9), konnten jeweils nur 5 % der in der zugeordneten Kontrollgruppe nachgewiesenen Zahlen an DPMZ (Abb. 5) und IPMZ (Abb. 6) ermittelt werden. Dennoch bewirkte die zweite antigene Stimulierung eine typische Sekundärreaktion, die zu einer bevorzugten Bildung von IPMZ (Abb. 8) und humoralen 7S-Hämolysinen (Abb. 11) führte. Zwar repräsentierte

der Höchstwert an IPMZ in der geboosterten Cyclophosphamid-Gruppe nur ein Drittel des entsprechenden Kontrollwertes, womit die Serumhämolysintiter korrelierten, doch zeigt sich andererseits eine typische Sekundärreaktion durch die eindeutig bevorzugte Bildung 7S-Hämolysin produzierender Milzzellen. Diese Befunde lassen erkennen, daß das Ausmaß der immunologischen Zweitreaktion weder von der Stärke der primären Immunitätsreaktion noch von der zum Zeitpunkt der Boosterung vorhandenen Zahl an Antikörper bildenden Zellen abhängig sein dürfte. Vielmehr ist zu vermuten, daß sich nach Erstimmunisierung die das Ausmaß der immunologischen Sekundärreaktion determinierenden sogenannten "memory" Zellen unabhängig von den Antikörper bildenden Zellen bilden, was jüngst auch von BYERS u. SERCARZ (1968) diskutiert wurde. Daß diese "memory" Zellen nach Cyclophosphamidbehandlung weniger stark beeinflußt werden als die Antikörper produzierenden Zellen, ließe sich dadurch erklären, daß cytotoxische Substanzen zuerst und überwiegend die Zellen mit lebhaftem Stoffwechsel zerstören (AISENBERG 1967).

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Untersuchung wird unter Verwendung von Schaferythrocyten als Antigen bei Mäusen im Vergleich zur Primärreaktion über die Kinetik der immunologischen Zweitreaktion auf zellulärer und humoraler Ebene berichtet. Dabei wurden folgende Hauptbefunde erhoben:

- 1) Erhalten Mäuse 43 Tage nach der erstmaligen intraperitonealen Immunisierung mit 4×10^8 Schaferythrocyten eine zweite Injektion von 4×10^8 Schaferythrocyten, unterscheidet sich die resultierende immunologische Zweitreaktion von der nach primärer Immunisierung regelmäßig zu beobachtenden durch die bevorzugte Bildung 7S-Hämolysin produzierender Milzzellen. Damit korrelieren erhöhte Serumhämolysintiter. Auf dem Höhepunkt der immunologischen Zweitreaktion erwiesen sich etwa 1,2 % aller Milzzellen als Antikörperproduzenten.
- 2) Erhalten zusätzlich mit abgetöteten Keuchhustenbakterien vorbehandelte Mäuse 43 Tage nach Applikation der immunisierenden Erythrocytendosis eine Zweitinjektion von 4×10^8 Schaferythrocyten, finden sich im Vergleich zu nicht mit Keuchhustenbakterien vorbehandelten Mäusen stark erhöhte Serumhämolysintiter, die sich überwiegend als resistent gegen 2-Mercaptoäthanol erwiesen. Dem entsprach eine Verdoppelung indirekter plaquebildender Milzzellen, deren Maximalwert 4 Tage nach Boosterung gefunden wurde. Die Differenz der Mittelwerte erwies sich als statistisch signifikant.
- 3) Nach erstmaliger intraperitonealer Injektion von 4×10^8 Schaferythrocyten fanden sich im Vergleich zur Kontrolle bei völligem Fehlen humoraler Hämolysine nur jeweils 5 % der Zahlen an direkten und indirekten plaquebildenden Milzzellen, wenn zur Zeit der Erstimmunisierung eine Gesamtdosis von 330 mg/kg Cyclophosphamid verabfolgt worden war. Dennoch induzierte die

43 Tage nach Erstimmunisierung injizierte zweite Antigendosis von 4×10^8 Schaferythrocyten eine typische Sekundärreaktion.

Aus diesen Befunden wird gefolgert, daß sowohl abgetötete Keime von Bordetella pertussis als auch Cyclophosphamid, jeweils mit der ersten immunisierenden Antigendosis appliziert, das lymphoreticuläre Gewebe der Maus für die immunologische Sekundärreaktion präparieren. Weiterhin wird die Auffassung vertreten, daß nach Erstimmunisierung die das Ausmaß der immunologischen Sekundärreaktion bestimmenden sogenannten "memory" Zellen unabhängig von den Antikörper produzierenden Zellen gebildet werden.

Tabelle 1: Der Einfluß von Bordetella pertussis auf die Milzfeuchtgewichte von mit Schaferythrocyten immunisierten Mäusen.

Versuchszeit (in Tagen nach Erstimmunisierung)	Immunisierung der Versuchsgruppen											
	I			II			III			K		
	4x10 ⁸ SE i.p.			4x10 ⁸ SE i.p. + 3x10 ⁹ PO i.p.			4x10 ⁸ SE i.p. + 8,0 mg Cy i.p.			keine		
	$\bar{x}$ (mg)	$\pm s$ (mg)	2 P	$\bar{x}$ (mg)	$\pm s$ (mg)	2 P	$\bar{x}$ (mg)	$\pm s$ (mg)	2 P	$\bar{x}$ (mg)	$\pm s$ (mg)	2 P
+ 3	126,8	6,0		211,3	15,1	<0,01	50,8	6,8	<0,01	116,5	0,5	
+ 5	109,2	12,2		267,2	19,9	<0,01	61,7	5,9	<0,01	145,5	19,5	
+ 7	153,8	17,6		316,8	27,0	<0,01	202,2	35,5	70,1	77,5	22,5	
+ 10	118,8	18,4		234,0	19,4	<0,01	148,0	14,4	70,1	105,5	26,5	
+ 17	119,0	13,9		254,5	21,3	<0,01	112,2	14,9	70,1	82,5	14,5	
+ 44	206,0	27,2		192,0	35,5	70,1	271,7	23,1	70,1	108,5	12,5	

$\bar{x}$ = statistischer Mittelwert

2p = statistische Signifikanz

PO = Pertussisorganismen

$\pm s$ = Standardabweichung des Mittelwertes

SE = Schaferythrocyten

Cy = Cyclophosphamid

Tabelle 2: Der Einfluß von Bordetella pertussis auf die Milzindices von mit Schaferythrocyten immunisierten Mäusen.

Versuchszeit (in Tagen nach Erstimmunisierung)	Immunisierung der Versuchsgruppen											
	I			II			III			K		
	$\bar{x}$ (mg/g)	$\pm s$ (mg/g)	2 P	$\bar{x}$ (mg/g)	$\pm s$ (mg/g)	2 P	$\bar{x}$ (mg/g)	$\pm s$ (mg/g)	2 P	$\bar{x}$ (mg/g)	$\pm s$ (mg/g)	2 P
	4x10 ⁸ SE i.p.			4x10 ⁸ SE i.p. + 3x10 ⁹ PO i.p.			4x10 ⁸ SE i.p. + 8,0 mg Cy i.p.			keine		
+ 3	5,6	0,3		9,4	0,5	<0,01	2,4	0,4	<0,01	5,0	0,1	
+ 5	4,5	0,5		10,9	0,6	<0,01	2,9	0,2	<0,01	6,1	1,1	
+ 7	5,8	0,7		12,0	1,0	<0,01	8,4	1,4	70,1	3,6	0,8	
+ 10	5,4	0,8		10,6	0,7	<0,01	6,9	0,4	70,05	4,4	1,9	
+ 17	4,7	0,5		9,0	0,7	<0,01	5,1	0,6	70,1	3,7	0,3	
+ 44	7,7	1,5		7,1	1,9	70,1	8,9	1,0	70,1	4,4	0,9	

Der Milzindex ist definiert als Milzfeuchtgewicht (mg) / Körpergewicht (g).

$\bar{x}$ = statistischer Mittelwert

2P = statistische Signifikanz

PO = Pertussisorganismen

$\pm s$ = Standardabweichung des Mittelwertes

SE = Schaferythrocyten

Cy = Cyclophosphamid

GRAPHISCHE DARSTELLUNGEN

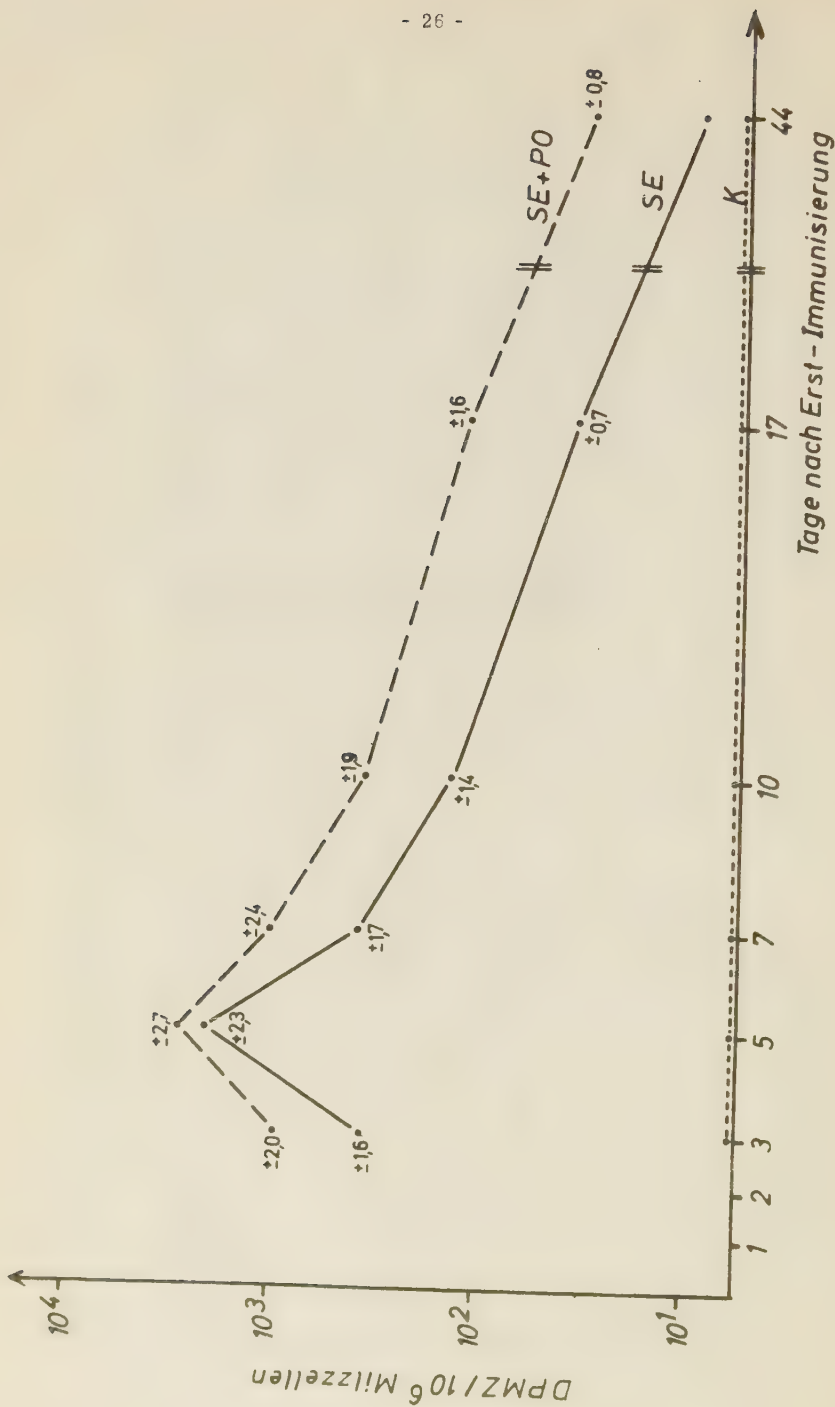


Abb. 1: Der Einfluß von Pertussisorganismen (PO) auf die Kinetik direkter plaquebildender Milzzellen (DPMZ) bei erstmals mit Schafererythrocyten (SE) immunisierten Mäusen.

Immunisierung der Versuchsgruppen: SE = 4×10^8 SE ip am Tage 0

SE+PO = simultan 4×10^8 SE ip
 + 3×10^9 PO ip am Tage 0

K = unbehandelte Kontrolle

Die Zahlen an den Markierungspunkten repräsentieren die Standardabweichungen der Mittelwerte.

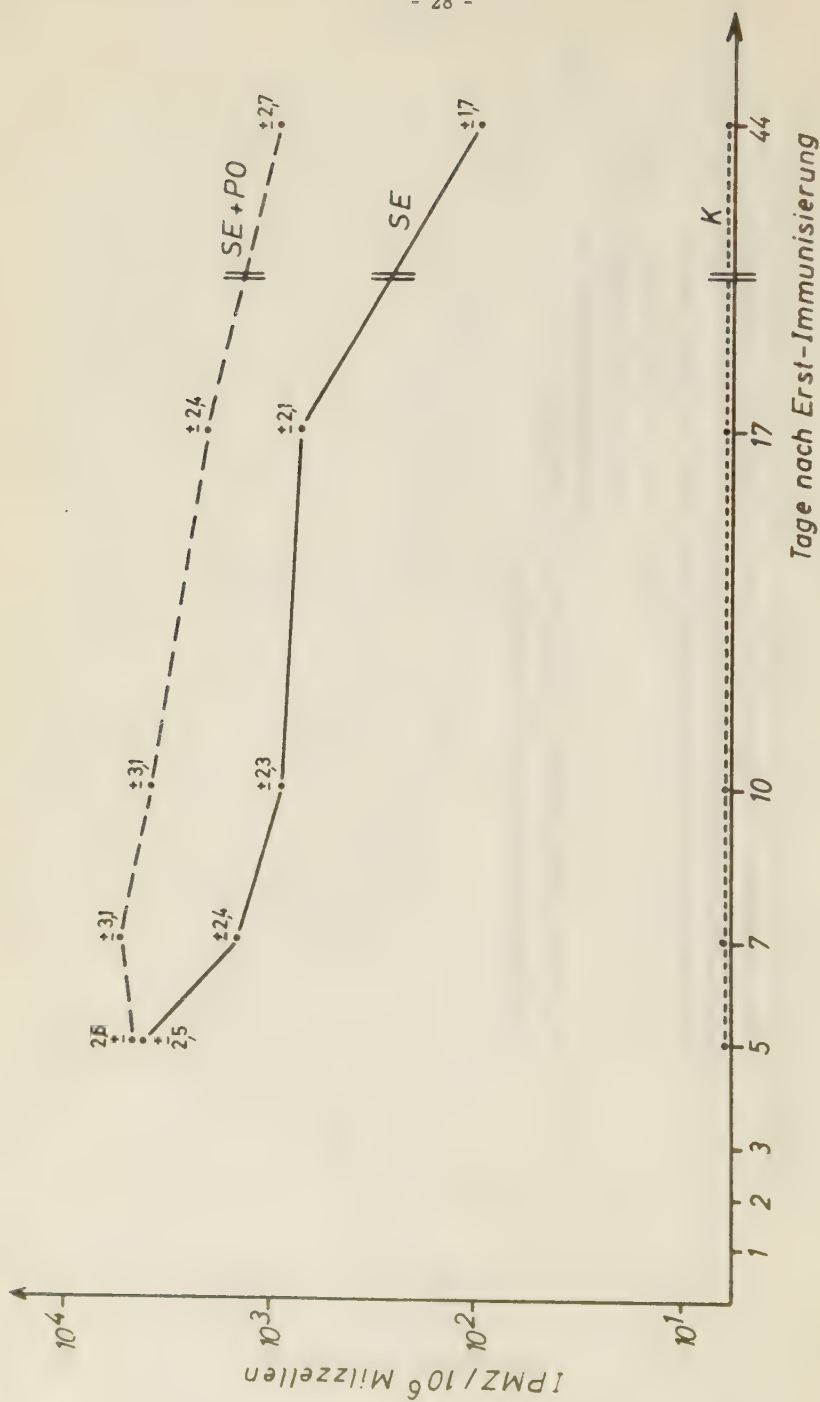


Abb. 2: Der Einfluß von Pertussisorganismen (PO) auf die Kinetik indirekter plaquebildender Milzzellen (IPMZ) bei erstmals mit Schaferthryocyten (SE) immunisierten Mäusen.

Immunisierung der Versuchsgruppen: SE = 4×10^8 SE ip am Tage 0
 SE+PO = simultan 4×10^8 SE ip
 + 3×10^9 PO ip am Tage 0
 K = unbehandelte Kontrolle

Die Zahlen an den Markierungspunkten repräsentieren die Standardabweichungen der Mittelwerte.

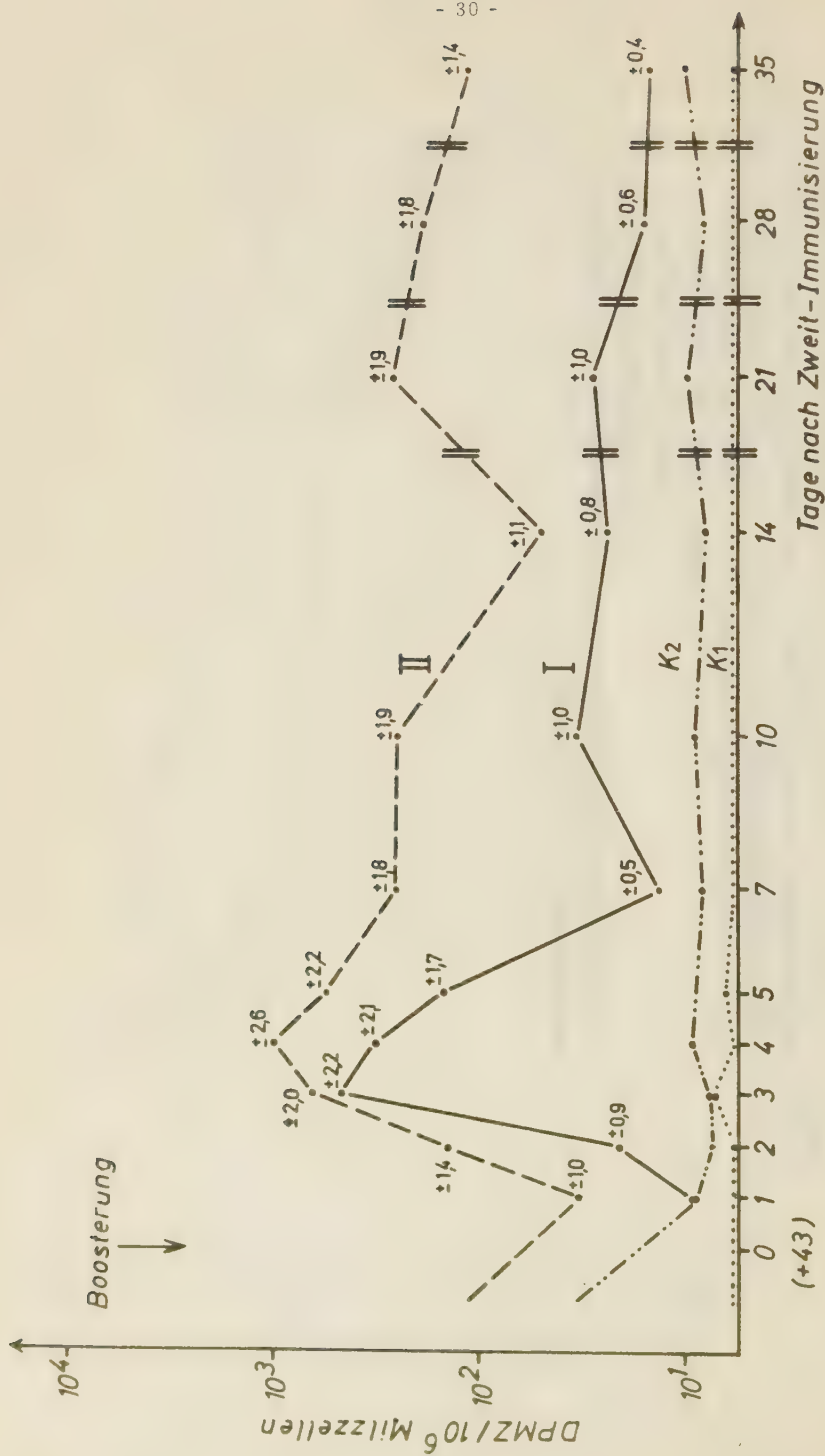


Abb. 3: Die unterschiedliche Kinetik direkter plaquebildender Milzzellen (DPMZ) nach Boosterinjektion bei primär mit Schaferythrocyten (SE) oder SE und Pertussisorganismen (PO) immunisierten Mäusen.

Immunisierungsmodus der Versuchsgruppen:

I: 4×10^8 SE ip am Tage 0; 4×10^8 SE ip am Tage +43

II: simultan 4×10^8 SE ip
+ 3×10^9 PO ip am Tage 0; 4×10^8 SE ip am Tage +43

K₁: unbehandelte Kontrolle
K₂: 4×10^8 SE ip am Tage 0

Die Zahlen an den Markierungspunkten repräsentieren die Standardabweichungen der Mittelwerte.

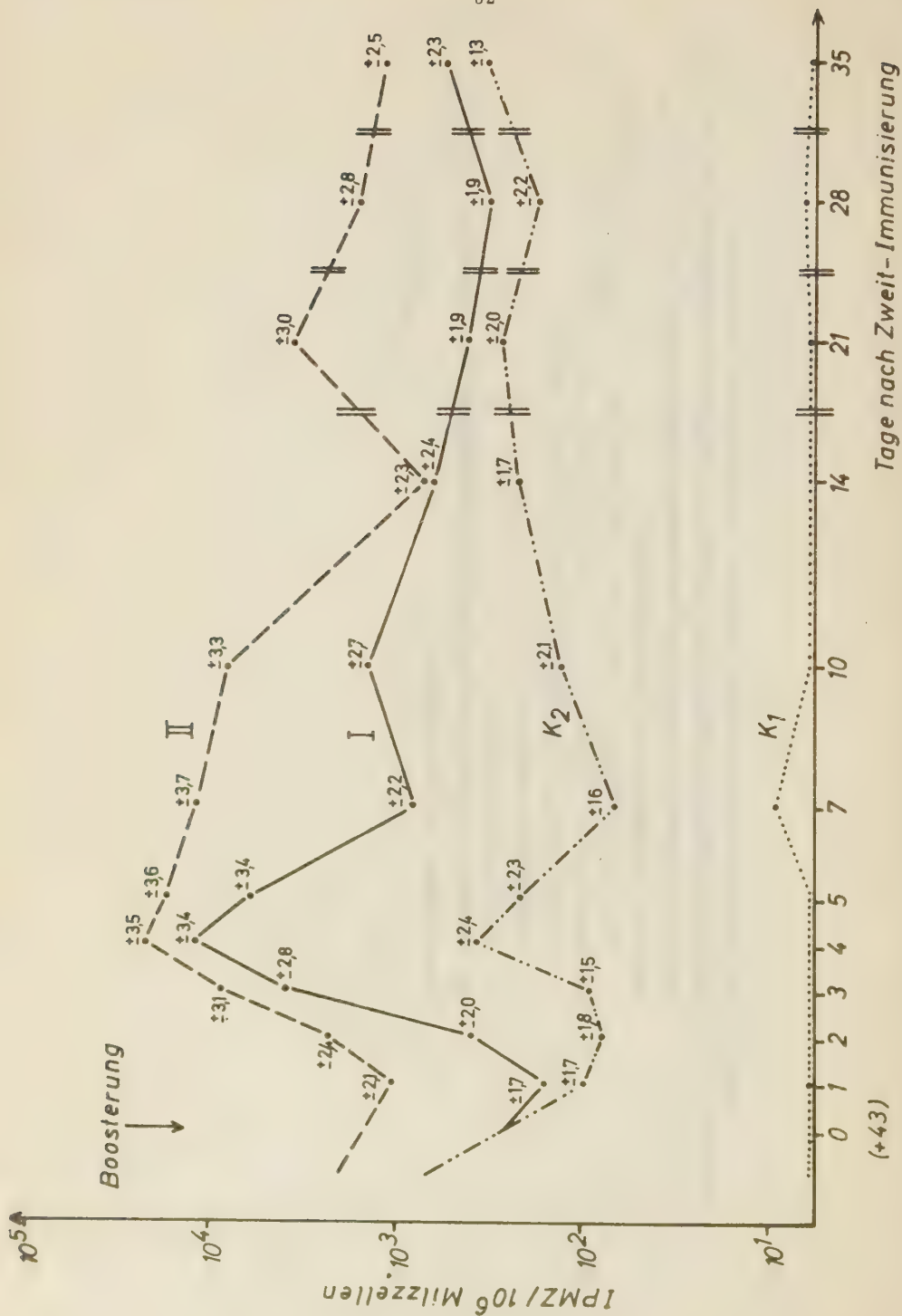


Abb. 4: Die unterschiedliche Kinetik indirekter plaquebildender Milzzellen (IPMZ) nach Boosterinjektion bei primär mit Schaferythrocyten (SE) oder SE und pertussisorganismen (PO) immunisierten Mäusen.

Immunisierungsmodus der Versuchsgruppen:

I: 4×10^8 SE ip am Tage 0; 4×10^8 SE ip am Tage +43

II: simultan 4×10^8 SE ip

+ 3×10^9 PO ip am Tage 0; 4×10^8 SE ip am Tage +43

K₁: unbehandelte Kontrolle

K₂: 4×10^8 SE ip am Tage 0

Die Zahlen an den Markierungspunkten repräsentieren die Standardabweichungen der Mittelwerte.

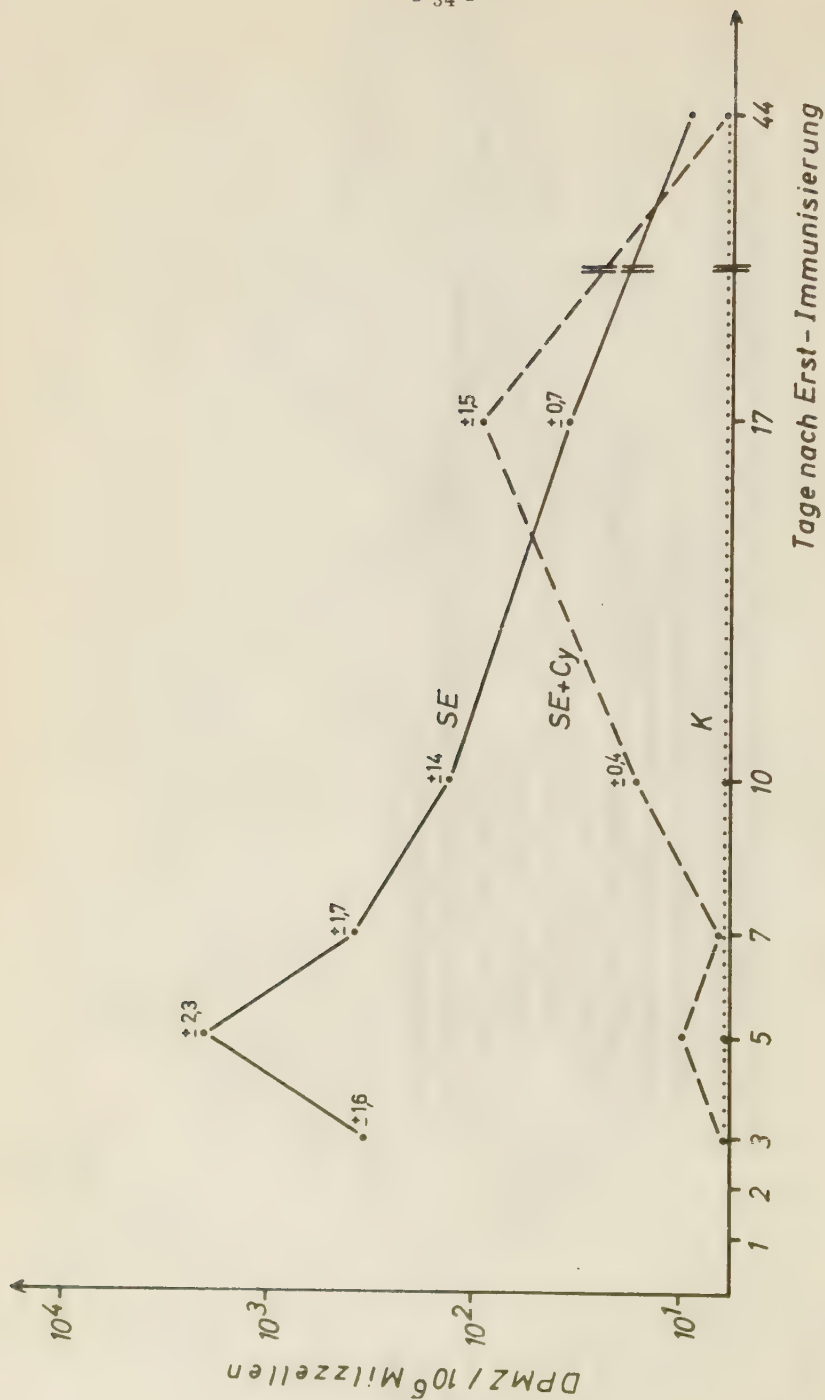


Abb. 5: Der Einfluß von Cyclophosphamid (Cy) auf die Kinetik direkter
plaquebildender Milzzellen (DPMZ) bei erstmals mit Schafer-
throcysten (SE) immunisierten Mäusen.
Behandlung der Versuchsgruppen: SE = 4×10^8 SE ip am Tage 0
SE+Cy = 4×10^8 SE ip am Tage 0
und je 2 mg Cy ip an den
Tagen -2, -1, 0, +1
K = unbehandelte Kontrolle
Die Zahlen an den Markierungspunkten repräsentieren die
Standardabweichungen der Mittelwerte.

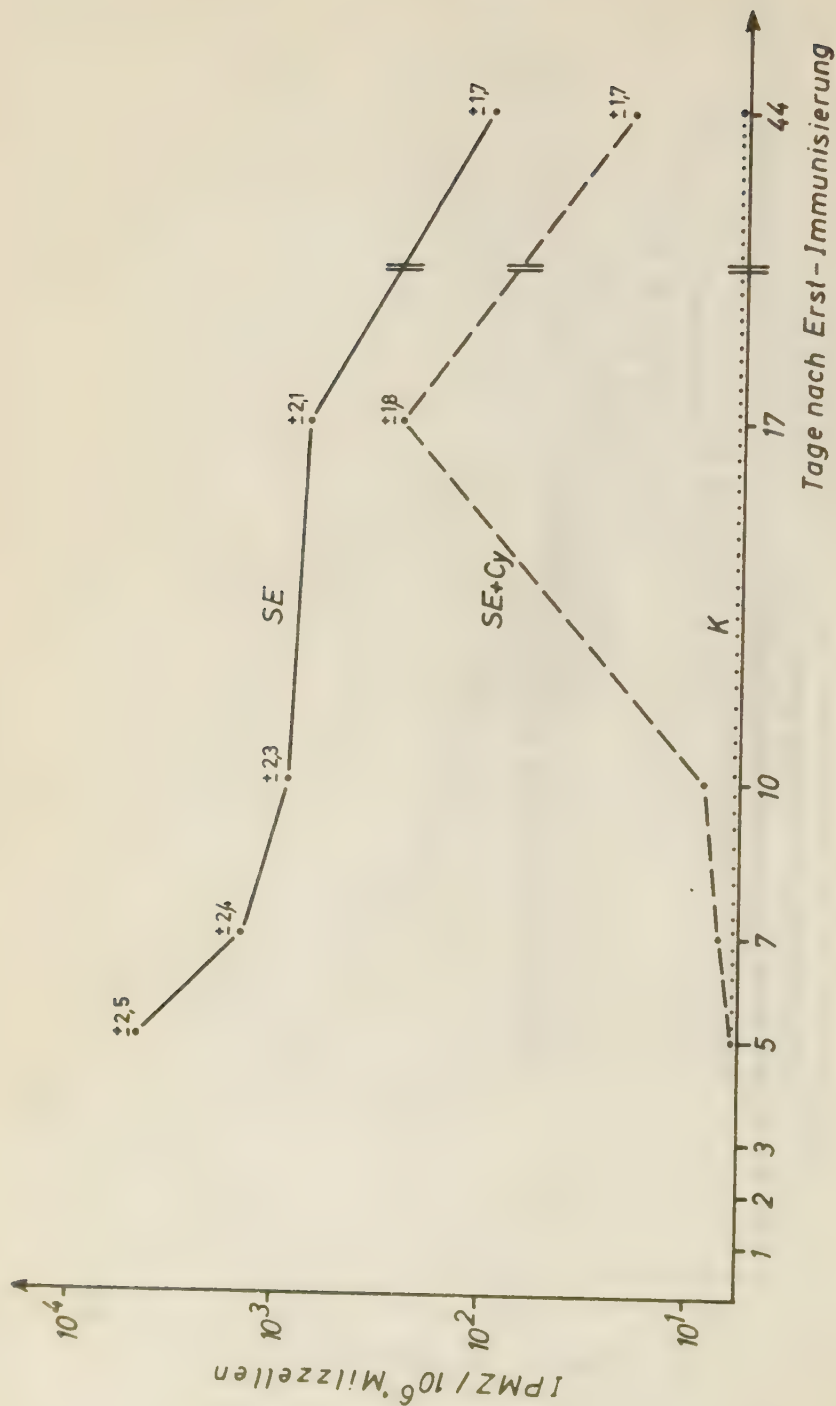


Abb. 6: Der Einfluß von Cyclophosphamid (Cy) auf die Kinetik indirekter plaquebildender Milzzellen (IPMZ) bei erstmals mit Schaferythrocyten (SE) immunisierten Mäusen.

Behandlung der Versuchsgruppen: SE = 4×10^8 SE ip am Tage 0
SE+Cy = 4×10^8 SE ip am Tage 0
und je 2 mg Cy ip an den
Tagen -2, -1, 0, +1

K = unbehandelte Kontrolle
Die Zahlen an den Markierungspunkten repräsentieren die
Standardabweichungen der Mittelwerte.

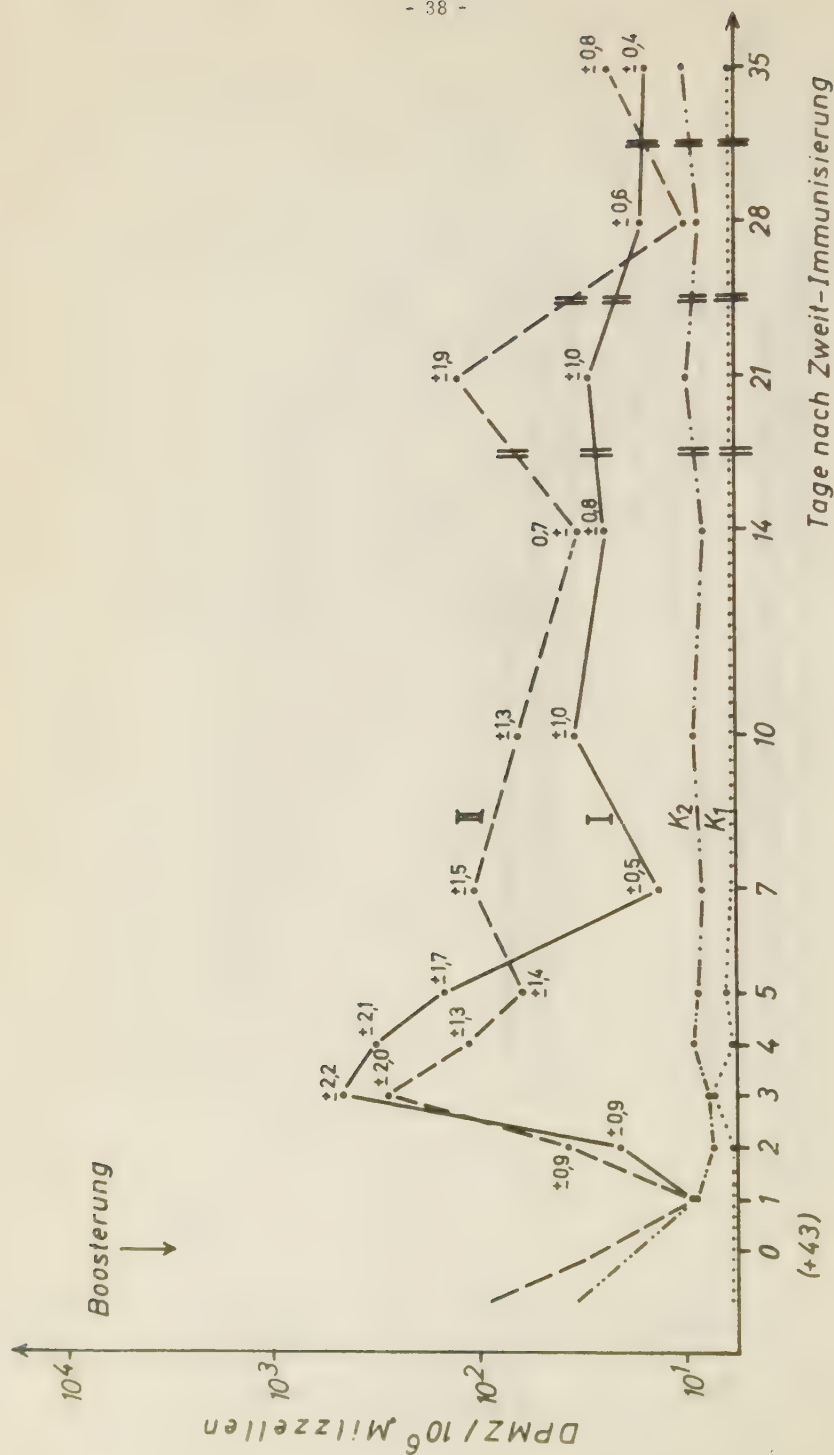


Abb. 7: Die unterschiedliche Kinetik direkter plaquebildender Milzzellen (DPMZ) nach Boosterung bei primär mit Schaferthryocyten (SE) oder SE und Cyclophosphamid (Cy) immunisierten Mäusen.

Behandlung der Versuchsgruppen:

I: 4×10^8 SE ip am Tage 0; 4×10^8 SE ip am Tage +43

II: 4×10^8 SE ip am Tage 0

+ 2 mg Cy ip an den Tagen -2, -1, 0, +1;

4×10^8 SE ip am Tage +43

K₁: unbehandelte Kontrolle

K₂: 4×10^8 SE ip am Tage 0

Die Zahlen an den Markierungspunkten repräsentieren die Standardabweichungen der Mittelwerte.

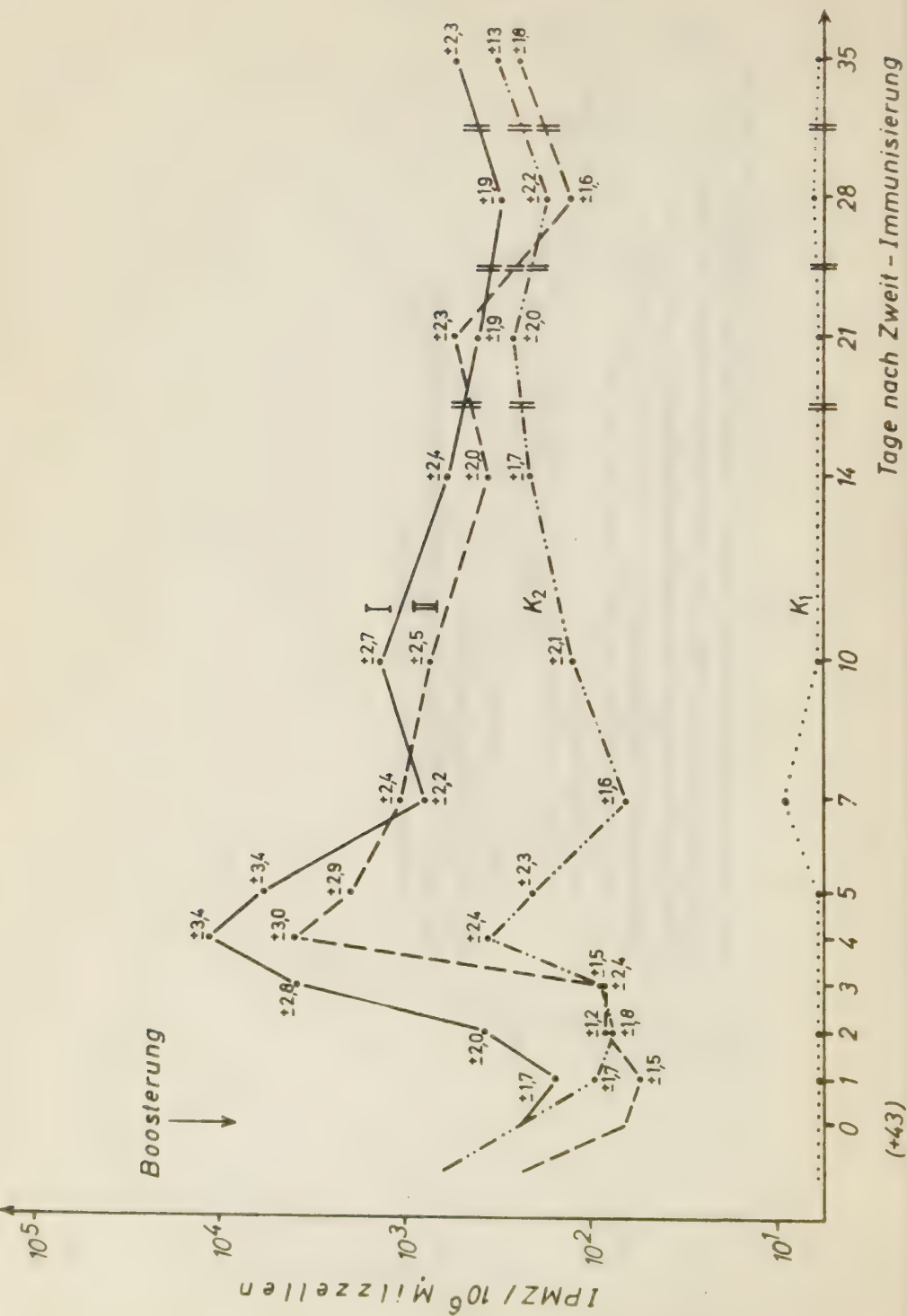


Abb. 8: Die unterschiedliche Kinetik indirekter plaquebildender Milzzellen (IPMZ) nach Boosterung bei primär mit Schaferthrombocyten (SE) oder SE und Cyclophosphamid (Cy) immunisierten Mäusen.

Behandlung der Versuchsgruppen:

I: 4×10^8 SE ip am Tage 0; 4×10^8 SE ip am Tage +43

II: 4×10^8 SE ip am Tage 0

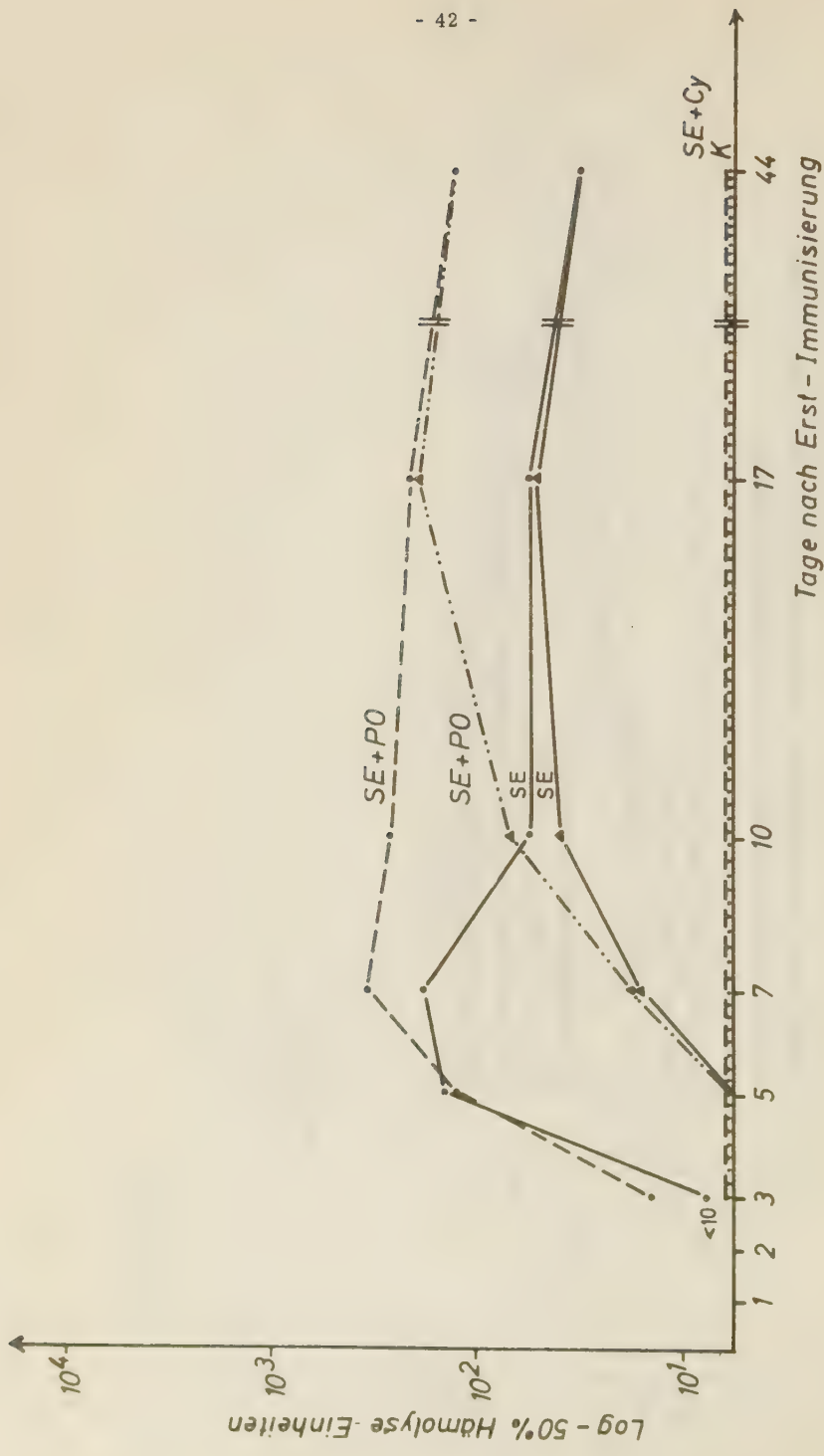
+ 2 mg Cy ip an den Tagen -2, -1, 0, +1;

4×10^8 SE ip am Tage +43

K₁: unbehandelte Kontrolle

K₂: 4×10^8 SE ip am Tage 0

Die Zahlen an den Markierungspunkten repräsentieren die Standardabweichungen der Mittelwerte.



SE+Cy
K

Abb. 9: Der Einfluß von Pertussisorganismen (PO) und Cyclophosphamid (Cy) auf die Ausbildung der humoralen Hämolytintiter bei erstmals mit Schaferythrocyten (SE) immunisierten Mäusen.

Behandlung der Versuchsgruppen: SE = 4×10^8 SE ip am Tage 0
 SE+PO = simultan 4×10^8 SE ip
 + 3×10^9 PO ip am Tage 0
 SE+Cy = 4×10^8 SE ip am Tage 0
 und je 2 mg Cy ip an den
 Tagen -2, -1, 0, +1

○ ——— ○)	Gesamthämolytine	K = unbehandelte Kontrolle
○ -.-.-.-○)		
^ ——— ^)	Anteil 2-Mercaptoäthanol-	resistenter Hämolytine
^ -.-.-.-^)		

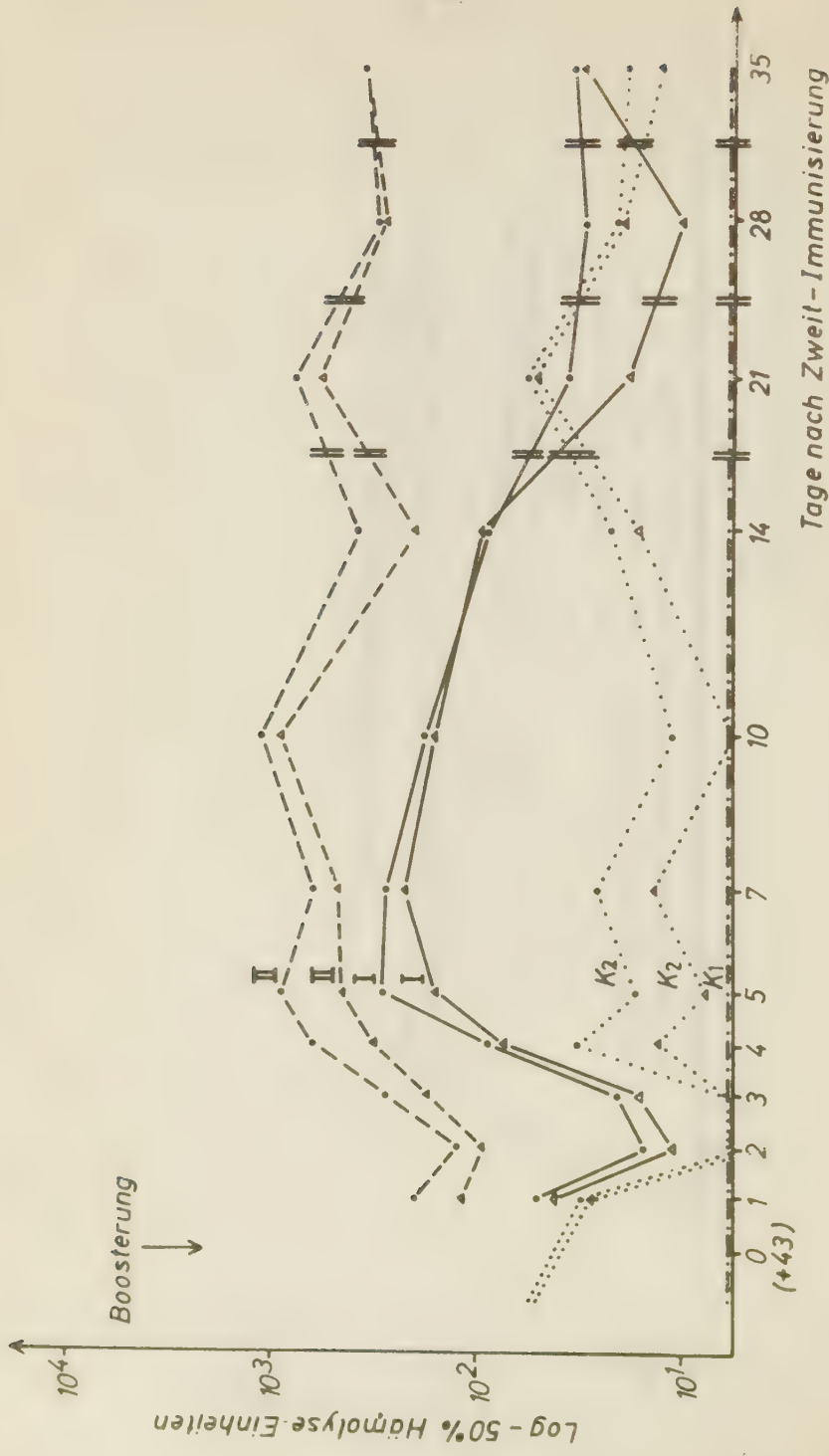


Abb. 10: Hämolysintiter nach Boosterung bei primär mit Schaferythrocysten (SE) oder SE und Pertussisorganismen (PO) immunisierten Mäusen.

Behandlung der Versuchsgruppen:

I: 4×10^8 SE ip am Tage 0; 4×10^8 SE ip am Tage +43

II: simultan 4×10^8 SE ip

+ 3×10^9 PO ip am Tage 0; 4×10^8 SE ip am Tage +43

K_1 : unbehandelte Kontrolle

K_2 : 4×10^8 SE ip am Tage 0

0 ——— 0) Gesamthämolysine

0 ----- 0)

^ ——— ^)

^ ----- ^)

Anteil 2-Mercaptoäthanol- resistenter Hämolysine

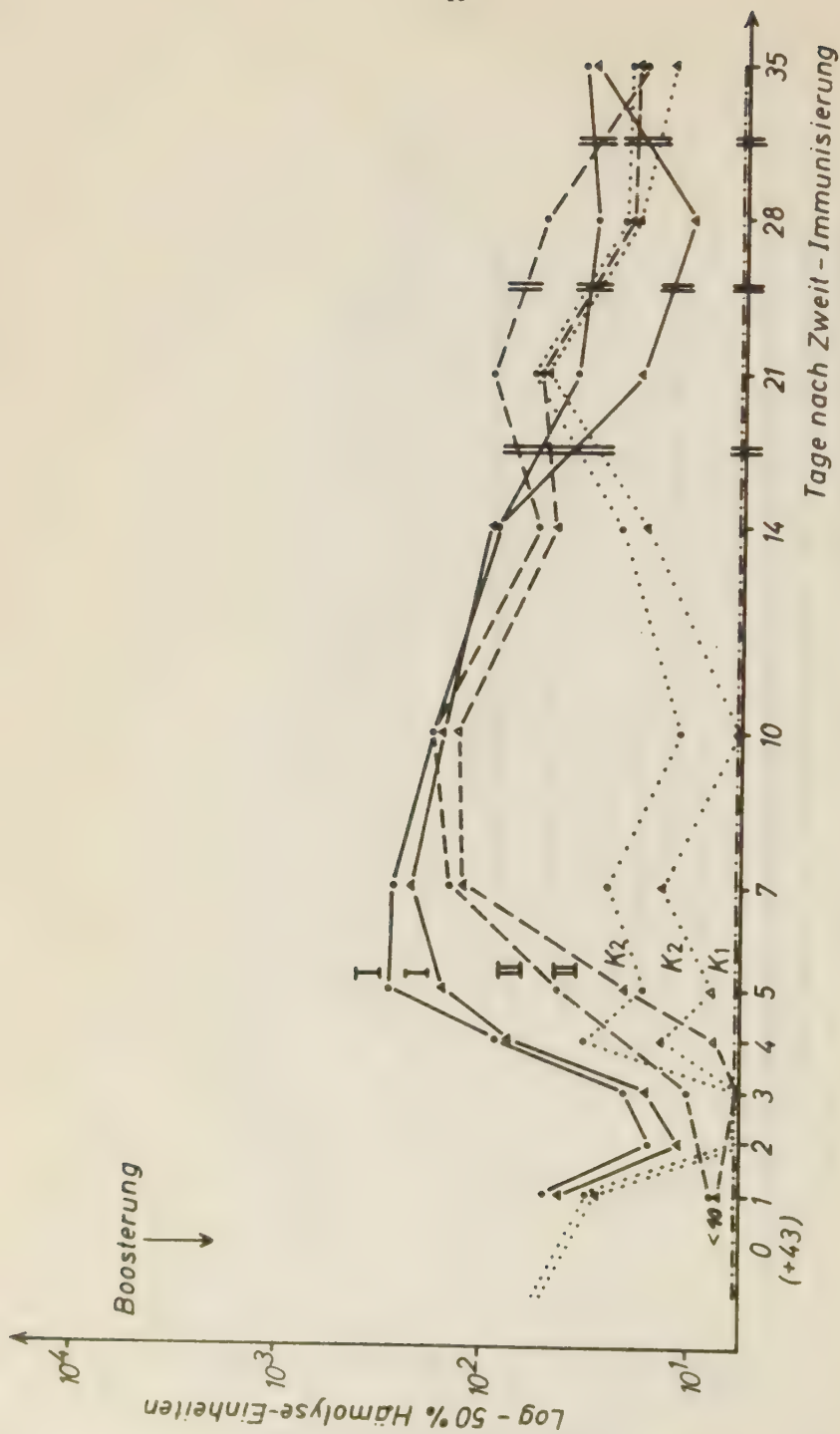


Abb. 11: Hämolysintiter nach Boosterung bei primär mit Schafererythrocyten (SE) oder SE und Cyclophosphamid (Cy) immunisierten Mäusen.

Behandlung der Versuchsgruppen:

I: 4×10^8 SE ip am Tage 0; 4×10^8 SE ip am Tage +43

II: 4×10^8 SE ip am Tage 0

+ 2 mg Cy ip an den Tagen -2, -1, 0, +1;

4×10^8 SE ip am Tage +43

K₁: unbehandelte Kontrolle

K₂: 4×10^8 SE ip am Tage 0

0 ——— 0)
0 ——— 0) Gesamthämolysine

^ ——— ^)
^ ——— ^) Anteil 2-Mercaptoäthanol- resistenter Hämolysine

Herrn Privatdozent Dr. H. Finger erlaube ich mir, für die freundliche Überlassung des Themas und für die Übernahme des Referates meinen ergebensten Dank auszusprechen. Für die Anleitung und Hilfsbereitschaft bin ich Herrn Privatdozent Dr. Finger zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Professor Dr. H. Seeliger, Vorstand des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg, danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und für die Übernahme des Korreferates.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) AISENBERG, A.C. : Studies on cyclophosphamide-induced
to sheep erythrocytes.
J. exp. Med. 125, 833 (1967)
- 2) BENEKE, G., FINGER, H. : Einfluß von Bordetella pertussis auf
u. EMMERLING, P. das lymphatische Gewebe von Mäusen.
II. Proliferierende Zellsysteme in der
Milz nach Injektion von Bordetella
pertussis.
Z. med. Mikrobiol. u. Immunol., in Druck
- 3) BYERS, V.S. u. SERCARZ, E.E. : The X-Y-Z scheme of immunocyte maturation.
IV. The exhaustion of memory cells.
J. exp. Med. 127, 307 (1968)
- 4) CAMPBELL, D.H., GARVEY, J.S., CREMER, N.E. u. : Methods in Immunology, Benjamin, W.A.,
SUSSDORF, D.H. INC. New York, Amsterdam, p. 172, 1964.
- 5) DIXON, F.J. : The metabolism of antigen and antibody.
J. Allergy 25, 487 (1954)
- 6) DIXON, F.J., MAURER, P.H. u. DEICHMILLER, M.P. : Primary and spezific anamnestic antibody responses of rabbits to heterologous serum protein antigens.
J. Immunol. 72, 179 (1954)
- 7) DRESSER, D.W. u. : Use of an antiglobulin serum to detect
WORTIS, H.H. cells producing antibody with low haemolytic efficiency.
Nature 208, 859 (1965)
- 8) FINGER, H., EMMERLING, P. u. SCHMIDT, H. : Accelerated and prolonged multiplication of antibody-forming spleen cells by Bordetella pertussis in mice immunized with sheep red blood cells.
Experientia 23, 591 (1967)
- 9) FINGER, H., BENEKE, G. u. EMMERLING, P. : Einfluß von Bordetella pertussis auf
das lymphatische Gewebe von Mäusen.
I. Erhöhung der Milzgewichte weißer
Mäuse nach Injektion von Bordetella
pertussis.
Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. 154, 23
(1968)

- 10) FINGER, H., BENEKE, G. : Hypersplenie der Maus nach Injektion
u. EMMERLING, P. von Bordetella pertussis.
Z. Naturforsch. 23b, 288 (1968a)
- 11) FINGER, H. u. EMMERLING, P. : Agarqualität und Diäthylaminoäthyl-
Dextran als kritische Komponente der
LHG-Technik.
Z. Immunforsch. 136, 145 (1968)
- 12) FINGER, H. : Possible mechanism of adjuvant action.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., in
Druck
- 13) FINGER, H. u. EMMERLING, P. : Einfluß von Bordetella pertussis auf
das lymphatische Gewebe von Mäusen.
IV. Der Einfluß von Bordetella pertussis
auf die Kinetik der Antikörperbil-
dung bei mit Cyclophosphamid behan-
delten Mäusen.
Z. Immunforsch., in Druck.
- 14) HEGE, J.S. u. COLE, L.J. : Antibody plaque-forming cells: Kinetics
of primary and secondary responses.
J. Immunol. 96, 559 (1966).
- 15) INGRAHAM, S. u. BUSSARD, A. : Application of a localized haemolysin
reaction for spezific detection of in-
dividual antibody-forming cells.
J. exp. Med. 119, 667 (1964)
- 16) JERNE, N.K., NORDIN, A.A. u. HENRY, C. : The agar plaque technique for recogni-
zing antibody-producing cells.
In: Cell-bound Antibodies (B. Amos and
H. Koprowski, eds.) p.109.
Wistar Institut Press, Philadelphia, 1963
- 17) JERNE, N.K. u. NORDIN, A.A. : Plaque formation in agar by single anti-
body-producing cells.
Science 140, 405 (1963)
- 18) LA VIA, M.F. : Primary and secondary response in rats
to bacterial and sheep erythrocyte
antigens.
J. Immunol. 92, 252 (1964)
- 19) MAKINODAN, T. u. ALBRIGHT, J.F. : Proliferative and differentiative mani-
festations of cellular immune potential.
Prog. Allergy 10, 1 (1966)

- 20) MAKINODAN, T. u. : Primary antibody response to a distant-
GENGOZIAN, N. ly related heterologous antigen during
maximum depression period after varying
doses of X-radiation.
J. Immunol. 81, 150 (1958)
- 21) MAKINODAN, T. u. : Primary antibody response to a closely
GENGOZIAN, N. related heterologous antigens after
varying doses of X-radiation and its
significance to related biologic
phenomena.
J. Immunol. 81, 513 (1958 a)
- 22) MÜLLER, F. : Grundriß der medizinischen Immunologie.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1963
- 23) NOSSAL, G.J.V., AUSTIN, : Antigens in immunity.
C.M. u. ADA, G.L. VII. Analysis of immunological memory.
Immunology 9, 333 (1965)
- 24) ROWLEY, D.A., FITCH, : The rate of division of antibody-for-
F.W., MOSIER, D.E., ming cells during the early primary
SOLLIDAY, S., COPPLESON, immune response.
L.W. u. BROWN, B.W. J. exp. Med. 127, 983 (1968)
- 25) STERZL, J. u. RIHA, I. : Detection of cells producing 7S anti-
bodies by the plaque technique.
Nature 208, 858 (1965)
- 26) STERZL, J. : The effect of immunosuppressive drugs
at various stages of differentiation
of immunologically competent cells.
In: Immunity, Cancer and Chemotherapy
(E. Mihich, ed.) p. 71.
Academic Press, New York and London, 1967
- 27) SVEHAG, S.E. u. : The formation and properties of polio-
MANDEL, B. virus neutralizing antibody 19S and 7S
antibody formation. Differences in an-
tigen dose requirement for sustained
synthesis, anamnesis and sensitivity
to X-irradiation.
J. exp. Med. 119, 21 (1964)
- 28) TALIOFERRO, W.H. u. : The dynamics of haemolysin formation
TALIOFERRO, L.G.J. in intact and splenectomized rabbits.
J. Infect. Diseases 87, 37 (1950)

- 29) TALIOFERRO, W.H. u. : The role of the spleen and dynamics
TALIOFERRO, L.G.J. of haemolysin production in homologous
anamnesis.
J. Infect. Diseases 90, 205 (1952)
- 30) TUSCH, H. : Untersuchungen zur Wirkungsweise von
Bordetella pertussis als immunologisches
Adjuvans.
Inaugural-Dissertation, Würzburg, 1968
- 31) UHR, J.W. u. : The kinetics of antibody formation.
FINKELSTEIN, M.S. Prog. Allergy 10, 37 (1967)

LEBENS LAUF

Am 24.4.1942 wurde ich, Erika Brüb als Tochter des Kaufmannes Otto Brüb und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Conrad, in Apolda/Thür. geboren. Ich besuchte dort die Grundschule bis zur 8. Klasse. Ab 1955 besuchte ich das Staatliche Gymnasium in Hechingen/Hohenzollern, wo ich im März 1962 mein Abitur ablegte. Im folgenden Sommer immatrikulierte ich mich an der Universität Tübingen für das Fach Medizin. 1963 legte ich mein Vorphysikum ab und bestand im Oktober 1964 die ärztliche Vorprüfung. Anschließend ging ich an die Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Hier schloß ich im Dezember 1967 mein Studium erfolgreich mit dem Staatsexamen ab.

Seit dem 16.1.1968 bin ich als Medizinalassistentin bei dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg zugelassen.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Erika Brüb

